

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für
Psychiatrie und Psychotherapie
der Ludwig-Maximilians Universität
München

Untersuchungen zum Einfluss von
Methylenblau (Tetramethylthioninchlorid)
auf das Verhalten adulter
neuronaler Stammzellen der Maus

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Amelie Theresa van der Ven
aus Bonn
2014

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. J. Benninghoff

2. Gutachter : Herr Univ.-Prof. Dr. P. A. Horn

Tag der mündlichen Prüfung: 12. März 2015

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	7
1.1. Adulte neuronale Stammzellen	7
1.1.1. Historischer Überblick	7
1.1.2. Charakterisierung und Grundlagen der Untersuchung	8
1.1.3. Anatomische Grundlagen	9
1.1.4. Neurogenese im ZNS adulter Säugetiere	11
1.2. Morbus Alzheimer	16
1.2.1. Historischer Überblick und Prävalenz	16
1.2.2. Klinische Manifestation	17
1.2.3. Pathogenese	17
1.2.3.1. Amyloid- β -Protein	18
1.2.3.2. Tau-Protein	19
1.2.3.3. Dysregulierte Neurogenese	20
1.2.4. Medikamentöse Therapieoptionen	21
1.3. Methylenblau	23
1.3.1. Historischer Überblick	23
1.3.2. Pharmakologische Eigenschaften	24
1.3.3. Molekulare Zielstrukturen	26
1.4. Aufgabenstellung	27
Material und Methoden	28
2.1. Adulte neuronale Stammzellen (ANSC)	28
2.1.1. Dissektion des Hippokampusareals	28
2.1.2. Dissoziation des Hirngewebes und Primärkultur	28
2.1.3. Kultivierung der ANSC	29
2.2. Testsubstanz	31
2.3. Long Term Proliferation	33
2.4. Short Term Proliferation/ BrdU-Assay	33
2.5. Migration	36
2.6. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion / Real-Time RT PCR	38
2.6.1. Gewinnung der Zellen	38
2.6.2. RNA-Extraktion	38
2.6.3. Reverse Transkription	40
2.6.5. Primerdesign	43

Ergebnisse	44
3.1. Long Term Proliferation	44
3.2. Short Term Proliferation/ BrdU- Assay	45
3.3. Migration.....	49
3.4. Real-Time RT PCR/ quantitative PCR	50
3.4.1. Standard Curve Method.....	51
3.4.2. Housekeeping-Gene.....	51
3.4.3. Genes of Interest.....	52
3.4.3.1. Beta-site APP Cleaving Enzyme 1 (BACE-1)	52
3.4.3.2. Synaptophysin (SYP)	53
3.4.3.3. Tryptophan Hydroxylase 2 (TPH-2).....	55
3.4.3.4. Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF).....	56
Diskussion.....	58
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	58
4.2. Diskussion der Ergebnisse	59
4.2.1. Methylenblau und Prozesse der Neuroplastizität	59
4.2.1.1. Migration als Mechanismus der neuronalen Plastizität	60
4.2.1.2. Pathophysiologische Relevanz postnataler Migrationsprozesse	61
4.2.1.3. Regulation der Migration.....	63
4.2.1.4. Methylenblau und postnatale Migration.....	64
4.2.2. Methylenblau und der Amyloidstoffwechsel	66
4.2.2.1. BACE-1 – „Konventionelles Verständnis“	67
4.2.2.2. BACE-1 – „Alternative Hypothesen“.....	68
4.2.2.3. Vereinbarkeit der Studienergebnisse mit „Alternativen Hypothesen“ zu BACE-1	69
4.2.2.4. Wirkungsweise Methylenblaus' in der Alzheimerdemenz - Erklärungstheorien.....	71
4.3. Limitationen und technische Einschränkungen	72
4.4. Ausblick	74
Zusammenfassung	77
Literaturverzeichnis	78
Anhang	89
7.1. Abbildungs-, und Tabellenverzeichnis	89
7.2. Abkürzungsverzeichnis.....	90
7.3. Geräte und Materialien	91
7.4. Stammlösungen.....	93

Einleitung

1.1. Adulte neuronale Stammzellen

1.1.1. Historischer Überblick

1913 bestätigte Santiago Ramon y Cajal in seinem Forschungsartikel „Degeneration and Regeneration of the Nervous System“ die „Neuron Doctrine“ (Ramon y Cajal 1913). Er trug damit essentiell zum heutigen wissenschaftlichen Verständnis des Nervensystems bei. Eine weitere, von Ramon y Cajal postulierte These sollte ebenfalls über Jahrzehnte die akademische Vorstellung vom adulten ZNS prägen. Frühere Aussagen von Koelker (Koelker 1896-1902) und His (His 1904) aufgreifend, erklärte Cajal hierin die Neurogenese als einen ausschließlich auf die pränatale Periode eines Individuums limitierten Prozess (Ramon y Cajal 1913). Die These stand im Widerspruch zu Ergebnissen von Forschungsgruppen, die zuvor bereits Hinweise auf eine Existenz von teilungsaktiven Zellen im postnatalen ZNS von Ratten hatten gewinnen können (Hamilton 1901, Allen 1912). Eine Verfolgung der weiteren Entwicklung der identifizierten Zellen war durch die limitierten wissenschaftlichen Methoden der damaligen Zeit jedoch nicht möglich (Ming and Song 2005). Es konnte des Weiteren nicht belegt werden, dass es sich um nicht-gliale Zellen handelte, welches Cajal in einer Kritik dieser Forschungsergebnisse angeführt hatte (Ming and Song 2005). Das adulte ZNS von Säugetieren sollte demzufolge für viele Jahrzehnte als überwiegend postmitotisches und mit sehr geringen Möglichkeiten der Selbstregeneration ausgestattetes Gewebe gelten (Rakic 1985, Filbin 2003).

1959 wurde es durch die Einführung der Thymidin- H^3 -Autoradiographie erstmals möglich, die DNA sich teilender Zellen zu markieren und mittels Autoradiographie zu detektieren (Sidman, Miale et al. 1959). Mit dieser Methode gelang es Altman et al. in den sechziger Jahren, Hinweise auf eine postnatale Neurogenese in verschiedenen Arealen des Gehirns adulter Ratten zu erhalten (Altman and Das 1967, Altman, Anderson et al. 1969). Eine unklare funktionelle Relevanz der adulten Neurogenese trug jedoch dazu bei, dass die Funde nur in geringem Maße die öffentliche Aufmerksamkeit erregten (Ming and Song 2005).

Mit der Einführung des Bromodeoxyurin-Assays durch Gratzner gelang 1982 eine „Revolution“ auf dem Gebiet der Neurogeneseforschung (Gratzner 1982). Bromodeoxyurin, welches als Thymidinanalogon einen Marker der Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus darstellt, konnte in diesem Protokoll mittels Immunozytochemie zur Analyse und Quantifizierung sich teilender Zellen verwendet werden. Der eindeutige Nachweis eines kontinuierlichen Zellumsatzes in limitierten Arealen des adulten ZNS war durch diese Methode möglich geworden. Das neurowissenschaftliche Dogma „no neurons after birth“, das für nahezu ein Jahrhundert gegolten hatte, war widerlegt (Gross 2000).

Innerhalb weniger Jahre erfolgte ein rascher Fortschritt auf dem Gebiet der Neurogeneseforschung. 1992 gelang erstmals die Isolation von adulten neuronalen Stammzellen (ANSC) aus dem Gehirn adulter Nager (Reynolds and Weiss 1992). 1998 erfolgte durch Eriksson et al. die Erstbeschreibung adulter neuronaler Stammzellen im humanen Hippokampus (Eriksson, Perfilieva et al. 1998). Unterstützt durch eine Bereicherung des Spektrums an Forschungsmethoden (u.a. Retroviral-basierte Assays, sog. „lineage tracing“ und elektrophysiologische Studien) konnte eine Vielzahl neuer Erkenntnisse bezüglich der Identität, Lokalisation, Proliferation sowie der weiteren Entwicklung wie Migration und Integration in synaptische Regelkreise gewonnen werden (Alvarez-Buylla and Lim 2004).

Die Frage nach der funktionellen Signifikanz des Phänomens der adulten Neurogenese bleibt trotz des raschen Erkenntnisgewinns derzeit noch weitgehend ungeklärt. Hinweise auf Unterschiede in der Regulation der adulten Neurogenese im physiologischen bzw. pathologischen ZNS begründeten Hypothesen über eine mögliche Beteiligung der Neurogenese im Rahmen der Regeneration geschädigter Hirnareale im adulten Gehirn (Fuchs and Gould 2000, Duman, Malberg et al. 2001, Kempermann 2002). Derartige Erkenntnisse haben große Erwartungen bezüglich einer möglichen Verwendung adulter neuronaler Stammzellen in der Therapie von Gewebsverletzungen des ZNS oder Schäden im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen geweckt (Goh, Ma et al. 2003).

1.1.2. Charakterisierung und Grundlagen der Untersuchung

Stammzellen gelten als essentielle Bausteine multizellulärer Organismen (Weissman 2000). Abhängig von Ort und Zeit ihrer Entwicklung sowie ihres Differenzierungspotentials können verschiedene Varianten von Stammzellen unterschieden werden (Weissman 2000).

Der derzeitige bestehende Mangel an zuverlässigen Markern für Strukturen neuronaler Stammzellen erschwert eine unmittelbare Identifikation isolierter Zellen. Eine Definition auf Basis der funktionellen Charakteristika wird erforderlich (Bottai, Fiocco et al. 2003). Für eine Klassifizierung als ANSC wird vorausgesetzt, dass die undifferenzierte Zelle über ein Proliferationspotential verfügt, mit dem sie sich selbst erhalten, eine Vielzahl von differenzierten und funktionsfähigen Tochterzellen generieren, sowie Gewebe nach Schädigungen regenerieren kann (Potten and Loeffler 1990). Eine Flexibilität in der Ausübung der Funktionen ist hierbei essentiell für die Klassifikation als neuronale Stammzelle. Die weiteren genannten Charakteristika sind für die Klassifikation nicht als gleichwertig zu betrachten (Bottai, Fiocco et al. 2003). Als wesentliches Kriterium gilt die intrinsische Fähigkeit zum Selbst-Erhalt des Stammzellpools (Ming and Song 2005).

In der ANSC-Diagnostik konnten sich bislang im Wesentlichen zwei Herangehensweisen etablieren – Untersuchungen *in vivo* und *in vitro*. Die *in vivo* Diagnostik basiert maßgeblich auf

dem BrdU-Assay, der 1982 durch Gatzner (Gratzner 1982) etabliert wurde und durch Kuhn et al. (Kuhn, Dickinson-Anson et al. 1996) erstmals im Rahmen von Fragestellungen auf dem Gebiet der adulten Neurogenese Anwendung fand. Für eine Diagnostik der ANSC *in vitro* erfolgt eine Isolierung neuronaler Stammzellen aus Arealen, die mit Hilfe von *vivo* Untersuchungen zuvor als Regionen der adulten Neurogenese identifiziert werden konnten. Unter spezifischen Kulturbedingungen erfolgt anschließend eine selektive Anreicherung von ANSC. Die ANSC können im Folgenden abhängig von der Fragestellung (z.B. Proliferation, Migration, Differenzierung) mit spezifischen Versuchsmethoden untersucht werden.

1.1.2.1 Kultivierung

Spezielle Verfahren ermöglichen eine Kultivierung, Proliferation und bemerkenswerte Expansion isolierter ANSC *in vitro* (Galli, Gritti et al. 2003, Ming and Song 2005). Die Kultivierung erlaubt die Bildung eines selektiven Systems, in dem differenzierte Zelltypen zeitnah eliminiert werden, wohingegen sich undifferenzierte ANSC infolge einer positiven Selektion anreichern und in einen Zustand aktiver Proliferation eintreten (Gritti 2001).

Zwei unterschiedliche Kultivierungsmethoden konnten bisher etabliert werden (Gottlieb 2002). In der „Neurosphären-Kultur“ proliferieren die ANSC in einem nicht-adhäsiven Substrat und generieren frei schwimmende Zellkonglomerate sog. Neurosphären (Reynolds and Weiss 1992). Bei der adhäsiven Kultivierungsform wachsen die Zellen als Monolayer auf beschichteten (z.B. Laminin) Oberflächen (Ray, Peterson et al. 1993, Deisseroth, Singla et al. 2004). Beide Methoden erfordern den Einsatz spezifischer Wachstumsfaktoren im Kulturmedium. Epidermal Growth Factor (EGF) und Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2) stellen hierbei die zur Zeit etabliertesten Faktoren dar (Ming and Song 2005). Die hinzugefügten Wachstumsfaktoren unterstützen in Kombination mit weiteren, spezifischen Kulturbedingungen (niedrige Zelldichte von ca. 5×10^4 Zellen/ cm^2 , Abwesenheit von Serum) eine bevorzugte Proliferation der ANSC im Vergleich zu differenzierteren Zelltypen der Zellpopulation (Gritti 2001).

Die Möglichkeit der selektiven Anreicherung von ANSC macht die Kultivierung zu einem essentiellen Bestandteil in der Erforschung der in- sowie extrinsischen Regulationsmechanismen der adulten Neurogenese und ermöglicht einen unmittelbaren Vergleich zwischen funktionellen Charakteristika der Neurogenese unter physiologischen bzw. pathologischen Konditionen.

1.1.3. Anatomische Grundlagen

Adulte neuronale Stammzellen des ZNS verfügen *in situ* über eine sog. „trilineage ability“. Eine ANSC besitzt dementsprechend die Fähigkeit, wahlweise sowohl neuronale als auch gliale Tochterzellen (Oligodendrozyten und Astrozyten) zu generieren (Alvarez-Buylla and Temple 1998). Proliferationsfähige ANSC konnten bereits in vielfältigen Arealen des ZNS nachgewiesen werden (Galli, Gritti et al. 2003). Die lebenslange Neurogenese im intakten adulten ZNS scheint dennoch vorrangig auf zwei kortikale Regionen limitiert zu sein, die Subventrikularzone (SVZ)

der Seitenventrikel sowie die Subgranularzone des hippocampalen Gyrus dentatus (Gage 2000). Die genannten Hirnareale stellen Überreste embryonaler Germinalzonen dar und sind reich mit Stammzellen ausgestattet (Curtis, Low et al. 2012). Die übrigen Regionen des intakten ZNS gelten überwiegend als „nonneurogenic“. Unter physiologischen Bedingungen generieren ANSC in diesen Regionen vorrangig Gliazellen und keine Neuronen (Alvarez-Buylla and Temple 1998, Gage 2000).

1.1.3.1. Subventrikularzone

Die Subventrikularzone (SVZ) ist eine Hirnregion, die im adulten Gehirn unmittelbar unter der Ependymzellschicht an der lateralen Wand der Seitenventrikel zu finden ist (Curtis, Low et al. 2012). Im Rahmen der embryonalen Entwicklung des zentralen Nervensystems trägt die Neurogenese innerhalb der SVZ zur Produktion des größten Teils der Nervenzellen im sich entwickelnden Gehirn bei (Smart 1976). Nach Abschluss der frühen Hirnentwicklung erfolgt eine Verkleinerung der SVZ und die Zellteilungsaktivität reduziert sich maßgeblich (Curtis, Low et al. 2012). Im Gehirn adulter Säugetiere stellt die SVZ mit ca. 30.000 neuen Zellen pro Tag die Region mit der höchsten Rate an Neurogenese dar (Lois and Alvarez-Buylla 1994). Histologische Untersuchungen an der SVZ adulter Mäuse demonstrieren ein dreidimensionales Netzwerk, das vorrangig aus Zellen dreier verschiedener Klassen (Neuroblasten, Astrozyten sowie eine dünne Schicht ependymaler Zellen) gebildet wird (Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1997). Die Neuroblasten machen hierbei circa 34% der ansässigen Zellen aus (Tramontin, Garcia-Verdugo et al. 2003). Sie teilen sich an der Wand der Seitenventrikel zu Vorläuferzellen. Diese wandern anschließend entlang eines abgegrenzten Pfades, dem sog. rostralen migratorischen Strom (RMS) in den Bulbus olfactorius und differenzieren zu inhibitorischen Interneuronen (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo 2002).

Die Astrozyten der SVZ sind in Kanälen organisiert (Lois, Garcia-Verdugo et al. 1996). In Form von „glial tubes“ erzeugen sie innerhalb der SVZ ein für die spezielle Architektur essentielles Netzwerk (Lois, Garcia-Verdugo et al. 1996). Außerhalb der subventrikulären Germinalzone bilden sie einen wichtigen Bestandteil des RMS und beteiligen sich somit an der rostralwärts gerichteten Migration der in der SVZ generierten Neuroblasten (Lois, Garcia-Verdugo et al. 1996). Inwiefern die Anwesenheit der astroglialen „Tubes“ die Migration der Neuroblasten dirigiert oder räumlich limitiert, bleibt derzeit noch ungeklärt (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo 2002).

1.1.3.2. Hippokampus

Der Hippokampus ist ein überaus gut charakterisiertes Hirnareal. Als Teil des limbischen Systems ist er an einer Vielzahl komplexer Hirnfunktionen u.a. im Rahmen von Emotionen, Verhalten und Gedächtnis beteiligt. Der Hippokampus ist bilateral an der medialen Seite der Hirnhemisphären lokalisiert und wird in ein anteriores, mediales und posteriores Segment (auch: Kopf, Körper,

Schwanz) unterteilt. Im Transversalschnitt des Hippokampuskörpers kann der Gyrus dentatus (GD) als eine schmale, nach dorsal konkave Schicht identifiziert werden, die dem CA1 Abschnitt des Ammonshorns unmittelbar anliegt (Curtis, Low et al. 2012). Der Gyrus dentatus ist das Areal des Hippokampus, in dem Proliferation und Neurogenese stattfinden. Die Proliferation erfolgt hierbei im Besonderen in der Subgranularzellschicht (SGZ) des GD, welche an die hippokampale Körnerzellschicht angrenzt (Eriksson, Perfilieva et al. 1998). Nach aktuellem Kenntnisstand migrieren die in der SGZ generierten Zellen entgegen denen aus der SVZ nicht über weite Distanzen, sondern stellen die Quelle neuer Körnerneuronen für die angrenzende, hippokampale Körnerzellschicht dar (Eichenbaum 2004). Verglichen mit der SVZ findet die Neurogenese im adulten Hippokampus in einem wesentlich geringeren Ausmaß statt (Curtis, Low et al. 2012). Beispielsweise werden in der SGZ junger Ratten täglich circa 9.000 neue Zellen generiert (Cameron and McKay 2001).

Durch Forschungsarbeiten konnte eine Assoziation zwischen hippokampaler Neurogenese und Lernen, Stress sowie Umweltfaktoren, aber auch ausgewählten hirnerkrankungen wie z.B. der Alzheimer Demenz, Depressionen und Chorea Huntington identifiziert werden (Sheline, Wang et al. 1996). Es besteht die Aussicht, durch ein verbessertes Verständnis der zu Grunde liegenden Prozesse Therapien zu entwickeln, bei denen durch Beeinflussung der adulten Neurogenese der Krankheitsfortschritt verschiedener hippokampal manifestierter Erkrankungen wie z.B. der Alzheimer Demenz entschleunigt werden kann.

1.1.4. Neurogenese im ZNS adulter Säugetiere

1.1.4.1. Neurogenese unter physiologischen vs. pathologischen Konditionen

Mit der Beschreibung der ANSC im späten 20. Jahrhundert erfolgte eine Trennung von neurogenen und nicht-neurogenen Arealen des adulten Gehirns. ANSC in der SVZ und SGZ wurden maßgeblich für die (geringe) neurogenetische Aktivität des ZNS adulter Säuger verantwortlich gemacht. Den ANSC der übrigen Hirnareale wurde im Folgenden eine Rolle im Rahmen der Gliogenese zugesprochen (Gage 2000).

Eine Weiterentwicklung dieser Sichtweise erfolgte, als aus den traditionell nicht-neurogenen Arealen eine Isolation von Zellen gelang, die ein neurogenes Potential und in Kultur Eigenschaften multipotenter Stammzellen aufwiesen (Alvarez-Buylla and Temple 1998, Gage 2000, Anderson 2001, Temple 2001). Diese Ergebnisse wurden u.a. als Hinweis darauf gesehen, dass ANSC in vielfältigen Regionen des adulten ZNS latente neurogene Fähigkeiten besitzen, die unter Kulturbedingungen durch die Anwesenheit besonders hoher Konzentrationen an Wachstumsfaktoren aktiviert werden könnten (Palmer, Markakis et al. 1999). Alternative Erklärungstheorien postulierten, dass das im adulten ZNS herrschende Milieu inhibitorische Wirkungen auf ubiquitär vorhandene ANSC entfaltet (Goh, Ma et al. 2003). Eine Theorie, die unter anderem erklären könnte, weshalb die adulte Neurogenese unter physiologischen Bedingungen im

adulten ZNS extrem limitiert zu sein scheint. Bislang konnten vielfältige Faktoren identifiziert werden, die zu einem hemmenden Milieu im adulten ZNS beitragen könnten. Ein großer Teil der bisher charakterisierten Faktoren scheint hierbei mit dem Myelin des ZNS assoziiert zu sein wie z.B. Nogo, Myelin-associated glycoprotein oder oligodendrocyte myelin glycoprotein (Goh, Ma et al. 2003).

Forschungsarbeiten von van Praag et al. (van Praag, Schinder et al. 2002) und Carleton et al. (Carleton, Petreanu et al. 2003) zufolge, können pathologische Konditionen eine dramatische Veränderung des Milieus im adulten ZNS bewirken. Sie konnten demonstrieren, dass Gewebsverletzungen innerhalb des ZNS Veränderungen des Milieus auslösen, sodass es weniger inhibitorische, sondern vielmehr begünstigende Effekte auf eine neuronale Differenzierung der ANSC auszuüben scheint. Die geschilderten Veränderungen könnten erklären, weshalb nach speziellen Hirnverletzungen eine gesteigerte Proliferation von Vorläuferzellen in der SGZ und SVZ sowie Migration eines Teils der neu generierten Zellen in die geschädigten Areale beschrieben werden konnte (Carleton, Petreanu et al. 2003). Gewebsschäden, in deren Folge eine gesteigerte Neurogenese in der SVZ und SGZ nachgewiesen werden konnte, entstehen z.B. im Rahmen eines ischämischen Apoplex' oder sind Epilepsie-induziert (Parent 2003). Darüber hinaus existieren zunehmend Hinweise darauf, dass pathologische Stimuli zusätzliche Auswirkungen auf Regionen haben, die sich unter physiologischen Bedingungen nicht an der Neurogenese beteiligen (Parent 2003). Forschungsergebnisse von Nakatomi et al. konnten beispielsweise demonstrieren, dass ANSC unter pathologischen Konditionen auch in den traditionell als nicht-neurogen geltenden Arealen eine aktive Neurogenese betreiben können (Nakatomi, Kuriu et al. 2002). Inwiefern den generierten Neuronen dieser Areale eine funktionelle Integration in bestehende Regelkreise gelingt, konnte bisher nicht hinreichend geklärt werden (Ming and Song 2005).

1.1.4.2. Funktion der adulten Neurogenese

Die Frage nach der funktionellen Relevanz der Neurogenese im ZNS adulter Säugetiere unterliegt weiterhin größten Forschungsbemühungen. Nach der „Entdeckung“ einer Neurogenese im Hippokampusareal adulter Ratten propagierte Altman 1967, dass neu generierte Neuronen essentiell für Lern-, sowie Gedächtnisfunktionen seien (Altman, Anderson et al. 1967). Auch modernere Hypothesen vertreten eine essentielle Beteiligung neu entstandener Neurone an Lern- und Gedächtnisprozessen und möglicherweise Stimmungslagen (Ming and Song 2005).

Mit den im obigen Text geschilderten Forschungsergebnissen existieren jedoch zunehmend Hinweise darauf, dass die adulte Neurogenese eine intrinsische Antwort des ZNS auf Gewebsverletzungen sein könnte und evtl. eine (partielle) Regeneration geschädigter Strukturen ermöglicht (Gage 2000). Diesen Erkenntnissen zufolge ist die adulte Neurogenese ein dynamischer Prozess, der sich, kontrolliert durch eine Vielzahl unterschiedlicher Einflußgrößen, innerhalb

kürzester Zeit an pathologische Konditionen im Rahmen von hirnorganischen Schädigungen anpassen kann (Ming and Song 2005).

Faktoren wie z.B. FGF-2, BDNF, und Erythropoietin konnten mit einer Modulierung der adulten Neurogenese unter bestimmten pathologischen Konditionen bereits in Verbindung gebracht werden (Kokaia and Lindvall 2003). Der Großteil der zellulären und molekularen Einflussgrößen, die dem Verhalten der ANSC bei verschiedenen Pathologien zu Grunde liegen, verbleibt jedoch unbekannt (Ming and Song 2005). Die zunehmenden Kenntnisse über die Potentiale der ANSC haben die Hoffnung geweckt, adulte neuronale Stammzellen in der Therapie von akuten sowie chronischen Hirnschädigungen nutzbar machen zu können.

1.1.4.3. Therapeutisches Potential der adulten Neurogenese

Eine zunehmende Anzahl von Studienergebnissen weist darauf hin, dass auch in chronisch neurodegenerativen Erkrankungen eine signifikante Alteration der adulten Neurogenese vorliegt (Ming and Song 2005). Die Datenlage zur Tendenz der beobachtbaren Veränderungen ist hierbei jedoch partiell diskrepant (Mu and Gage 2011). Abhängig von der Versuchsanordnung wurden bisher sowohl Abnahmen (Crews, Adame et al. 2010) als auch Anstiege (Jin, Galvan et al. 2004) der Neurogeneseaktivität als Resultat neurodegenerativer Konditionen im adulten ZNS beschrieben (Mu and Gage 2011). Bei Patienten mit Chorea Huntington konnte eine deutliche Zunahme in der Generierung neuer Neuronen in subependymalen Schichten beobachtet werden (Curtis, Penney et al. 2003), die Studien nach Tattersfield et al. zufolge anschließend partiell ins defekte Striatum migrieren (Tattersfield, Croon et al. 2004). 2004 gelang durch Jin et al. in post-mortem Analysen der Hippokampusareale von Alzheimerpatienten der Nachweis einer gesteigerten Expression von Markern unreifer Vorläuferzellen (z.B. DCX und PSA-NCAM) in der SGZ sowie dem CA1-Areal des Ammonshorns (Jin, Peel et al. 2004). Nachfolgende Studien an transgenen Mausmodellen der AD konnten des Weiteren einen zweifachen Anstieg der BrdU-positiven Zellen im Hippokampusareal noch vor einem histopathologischen Ausbruch der Erkrankung mit einem Neuronenverlust und Amyloidablagerungen demonstrieren (Jin, Galvan et al. 2004). Diese Ergebnisse wurden als Hinweise auf eine gesteigerte Neurogenese in Patienten mit ausgewählten neurodegenerativen Erkrankungsbildern interpretiert. Eine Reaktion der ANSC, die nach Auffassung der entsprechenden Autoren (Jin, Galvan et al. 2004, Jin, Peel et al. 2004) dem endogenen Ersatz krankheitsbedingt zu Grunde gegangener Neuronen dienen und zukünftig therapeutisch nutzbar gemacht werden könnte (Jin, Galvan et al. 2004).

Dem gegenüber sind unter anderem Ergebnisse von Crews et al. zu sehen, die eine Verminderung Neurogenese-spezifischer Marker im Hippokampus von Patienten mit AD beschreiben konnten (Crews, Adame et al. 2010). Die Diskrepanzen der geschilderten Versuchsergebnisse könnten evtl. auf verschiedene Erkrankungsstadien und Therapieregime der entsprechenden Patienten

zurückzuführen sein oder durch unterschiedliche Methoden in der Markierung proliferierender Zellen erklärt werden (Mu and Gage 2011).

Die beschriebenen Unklarheiten erfordern in der Zukunft systematische Studien jenseits von Tiermodellen zur weiteren Abklärung der genannten Fragestellung. Sicher ist jedoch, dass die Existenz einer endogenen Reparaturfunktion der adulten Neurogenese eine neue Grundlage für Möglichkeiten in der Therapie krankheitsbedingt entstandener Hirnläsionen bieten könnte. In ZNS-Läsionen, bei denen alternative zerebrale Kompensationsmechanismen den Verlust der krankheitsbedingt untergegangenen Zellen nicht mehr ausgleichen können, könnte dementsprechend zukünftig ein therapeutischer, *endogener* Zellersatz mit Hilfe von ANSC eine vielversprechende Option zum langfristigen Funktionserhalt darstellen (Bottai, Fiocco et al. 2003). Diese therapeutische Option stellt eine Erweiterung der „traditionellen“ Überlegung zum Zellersatz durch Transplantation gesunder Zellen dar. Durch die Aktivierung endogener Zellen ermöglicht sie eine partielle oder sogar vollständige Vermeidung potentieller ethischer oder technischer Limitationen der bisherigen Therapien für Gehirnläsionen durch Implantation vitaler Zellen und könnte eine entscheidende Veränderung in der Behandlung neurodegenerativer Krankheitsentitäten bewirken (Bottai, Fiocco et al. 2003).

Die Stammzelltransplantation bildet bei Erkrankungen ausgewählter Organsysteme (vorrangig hämatopoetische Stammzellen bei Leukämien) eine langjährig etablierte Therapieoption. Auf dem Gebiet der neurologischen Erkrankungsbilder sind vergleichbare Überlegungen mit sehr großen Erwartungen assoziiert, jedoch vergleichsweise unerprobt.

Als Quelle von Zellen für Ersatztherapien bei zerebralen Erkrankungsbildern prüften Forschungsgruppen zunächst die Möglichkeit einer Verwendung fetaler Gewebstransplantate. Studien von Fricker sowie Gaiano und Fishell zufolge können Zellen humaner Feten nach Implantation ins Hirngewebe adulter Ratten erfolgreich zu Neuronen und Gliazellen differenzieren (Gaiano and Fishell 1998, Fricker, Carpenter et al. 1999). Eine großflächige Anwendung der genannten Therapieoption wird allerdings erschwert durch die mechanischen, immunologischen und ethischen Problematiken, die mit der Verwendung fetalen Gewebes einhergehen (Rohwedel, Guan et al. 2001).

Die experimentelle Manipulation von ANSC könnte in Zukunft eine Vorgehensweise darstellen, krankheitsbedingte Zellverluste im ZNS funktionell zu ersetzen. ANSC stellen eine gut verfügbare, syngene Ressource neuronaler Zellen dar und qualifizieren sich durch eine ausgeprägte Plastizität, ohne die Gefahr der Generierung „ZNS-fremder“ oder neoplastischer Zellen (Bottai, Fiocco et al. 2003).

Aktuell werden v.a. drei Vorgehensweisen bzw. Mechanismen als Optionen für einen ANSC-basierten Zellersatz diskutiert (Bottai, Fiocco et al. 2003). Eine mögliche Option besteht in einem unmittelbaren Ersatz geschädigter Zellen durch Transplantation (Bottai, Fiocco et al. 2003). Hierbei können die ANSC zunächst *in vitro* zum gewünschten Phänotyp differenziert und anschließend transplantiert werden (Bottai, Fiocco et al. 2003). Alternativ ist eine Transplantation nativer ANSC in das geschädigte Hirnareal möglich. Bei dieser Vorgehensweise erhofft man sich eine korrekte Differenzierung der ANSC gelenkt durch lokale Signale im Transplantationsareal (Bottai, Fiocco et al. 2003). Ein Zellersatz durch ANSC könnte hierbei ebenfalls mit Hilfe des sog. „by-stander-effects“ erfolgen, bei dem transplantierte ANSC das Milieu im geschädigten Hirnareal verändern, so dass es für eine endogene Regeneration vermehrt empfänglich wird.

Eine weitere, vielversprechende Option zum effektiven Ersatz von Hirngewebsdefekten stellen medikamentöse Therapien dar, die eine Mobilisierung endogener ANSC bewirken können. Derartige Therapieoptionen profitieren von intrinsischen Eigenschaften der ANSC, die befähigt sind, spontan Faktoren zu sezernieren und dadurch einen positiven Einfluss auf neuroprotektive und neuroregenerative Funktionen auszuüben (Mezey, Chandross et al. 2000). Eine therapeutische Nutzung intrinsischer Mechanismen ermöglicht des Weiteren eine Vermeidung potentieller ethischer oder technischer Limitationen der bisherigen Therapien für Gehirnläsionen (Bottai, Fiocco et al. 2003).

Die im obigen Abschnitt geschilderten Verfahren stellen vielversprechende Ansätze für die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen in der Zukunft dar. Bisher gewonnene Forschungsergebnisse weisen allerdings darauf hin, dass die bisher etablierten Therapiemethoden Gewebsdefekte im ZNS noch nicht im gewünschten Ausmaß funktionell ersetzen können (Brundin, Karlsson et al. 2000, Fuchs and Gould 2000, Li, Harms et al. 2010). Diesen Beobachtungen zufolge geht ein erheblicher Prozentsatz der aus endogenen ANSC stammenden oder durch Transplantation gewonnenen Zellen nach kurzer Zeit im adulten ZNS zu Grunde, oder entwickelt sich zu Gliazellen (Brundin, Karlsson et al. 2000, Fuchs and Gould 2000, Li, Harms et al. 2010).

Die bisher erfolgreichste ANSC-basierte Regeneration defekten ZNS-Gewebes konnte durch eine Anreicherung endogener ANSC mit Hilfe externer Stimuli herbeigeführt werden (Wang, Plane et al. 2011). Studien von Nakatomi et al. (Nakatomi, Kuriu et al. 2002) zufolge, konnte eine post-ischämische Verabreichung von EGF und FGF eine Zunahme der SVZ-Vorläuferzellen bewirken, die durch eine gesteigerte Generierung neuronaler Zellen mit anschließender Migration in das geschädigte Areal eine deutliche Reduktion der neurologischen Defizite herbeiführen konnten.

Für die Zukunft wäre es wünschenswert, weitere Substanzen/ Medikamente zu ermitteln, die über den Mechanismus der Aktivierung endogener ANSC positive Effekte auf den Verlauf neurologischer Krankheitsbilder haben. Zusätzlich sollten Medikamente, bei denen in Studien positive Effekte auf den Krankheitsverlauf neurodegenerativer Erkrankungen demonstriert werden

können, die aber einen unklaren Wirkmechanismus haben, hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung der adulten Neurogenese geprüft werden.

1.2. Morbus Alzheimer

1.2.1. Historischer Überblick und Prävalenz

Der Morbus Alzheimer ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung (Nussbaum and Ellis 2003). Histopathologisch ist die Alzheimer Demenz (AD) durch einen zunehmenden Neuronenverlust v.a. im Hippokampus und Kortex geprägt (Busciglio, Pelsman et al. 2002). Klinisch manifestiert sich die Erkrankung vornehmlich durch progrediente Defizite in den Gedächtnisfunktionen und weiteren kognitiven Leistungsbereichen (Caselli, Beach et al. 2006).

Als eigenständiges Krankheitsbild wurde die Alzheimer-Erkrankung erstmals im Jahr 1907 durch den Psychiater und Neuropathologen Alois Alzheimer beschrieben (Mu and Gage 2011). In einem Vortrag anlässlich der 37. Konferenz der südwestdeutschen Psychiater in Tübingen schilderte er den Fall der 51-jährigen Patientin Auguste D, die er im Jahr 1901 in Frankfurt a. M. medizinisch betreut hatte. 1906 konnte Alzheimer post mortem charakteristische histopathologische Veränderungen in ihrem Gehirn identifizieren (Maurer, Volk et al. 1997).

Alzheimer beschrieb mit dem Fall der Auguste D. erstmals das dementielle Erkrankungsbild, welches auf Initiative seines Lehrvaters Kraepelin mit „*Morbus Alzheimer*“ benannt wurde (Kraepelin 1910). Im Jahr 1907 publizierte Alzheimer eine detaillierte Beschreibung des klinischen Falles, sowie der zugehörigen Neuropathologie unter dem Titel: „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ (Alzheimer 1907, Stelzmann 1995).

Im Jahr 2012 gilt die AD als eine der volkswirtschaftlich relevantesten Erkrankungen des alternden Menschen (Corbett, Smith et al. 2012) : mit über 35 Millionen Patienten weltweit bildet die AD die größte Krankheitsentität in der Gruppe der dementiellen Erkrankungen (Querfurth and LaFerla 2010). Circa 50-56% der autopsisch untersuchten Gehirne von Demenzpatienten weisen AD-typische hirnpathologische Veränderungen auf (Querfurth and LaFerla 2010). Die verbleibenden Demenzfälle werden durch multiple Pathologien, v.a. aber durch vaskuläre Krankheitsprozesse, Pick-Erkrankung und Lewy-Körperchen-Demenz verursacht (Hebert, Scherr et al. 2003, Haass and Selkoe 2007). Die hohe Prävalenz der AD in Verbindung mit der im Krankheitsverlauf zunehmenden (intensiven) Pflegebedürftigkeit bedingt ein Kostenaufkommen von ca. 604 Milliarden U.S. Dollar, das weltweit jährlich von Sozialkassen, Betroffenen, sowie Angehörigen getragen werden muss (Wimo 2010). Bedingt durch die demographische Entwicklung in den Ländern der westlichen Welt ist mit einer steigenden Inzidenz zu rechnen. Für das Jahr 2050 werden 13.2-16. Millionen Erkrankungen in den USA (aktuell ca. 5.5 Millionen Erkrankte) prognostiziert (Hebert, Scherr et al. 2003).

Die volkswirtschaftliche Relevanz der AD ist unter anderem maßgeblich für die dringende Notwendigkeit einer wissenschaftlichen Erforschung der zu Grunde liegenden Pathogenese und der Entwicklung neuer Therapiestrategien.

1.2.2. Klinische Manifestation

Klinisch ist die AD geprägt von progredienten kognitiven Defiziten, welche sich besonders eindrücklich auf der Ebene der Gedächtnisfunktionen manifestieren. Vor allem Hippokampus- sowie olfaktorisch-geprägte Gedächtnisinhalte sind in der AD stark beeinträchtigt (Haxby, Raffaele et al. 1992, Albers, Tabert et al. 2006). Als weitere kognitive Defizite zeigen sich unter anderem Einschränkungen in der Urteilsfähigkeit, Entscheidungsfindung, räumlichen Orientierung sowie in der Sprache (Nussbaum and Ellis 2003).

Die AD hat nach Diagnosestellung typischerweise einen fünf-, bis achtjährigen Verlauf. Dieser ist durch eine zunehmende Einschränkung in der Bewältigung von Alltagsaktivitäten gekennzeichnet und mündet in der terminalen Phase in eine absolute Pflegebedürftigkeit (Forstl and Kurz 1999). Die Lebenserwartung ist nach der Diagnosestellung durchschnittlich um ein Drittel verkürzt. Pneumonie, Myokardinfarkt und Septikämie stellen hierbei die relevantesten Todesursachen dar (Forstl. 1993).

1.2.3. Pathogenese

Der Großteil der AD-Erkrankungen gehört zu der Gruppe der „sporadischen“ Form (Lazarov and Marr 2010). Im Gegensatz zu der familiär gehäuft auftretenden Form (FAD) konnten trotz starker Bemühungen für diese Entität bisher nur wenige genetische Einflussfaktoren nachgewiesen werden (Lazarov and Marr 2010). Den zur Zeit wichtigsten genetischen Risikofaktor stellt das Vorhandensein des ϵ 4-Allel im Apolipoprotein E (ApoE4) dar (Bu 2009). Als wichtigster, gesicherter Umweltfaktor gilt hohes Lebensalter mit einer sich nach dem 65. Lebensjahr ca. alle fünf Jahre verdoppelnden Inzidenz (Fratiglioni, Launer et al. 2000). Grundsätzlich wird bei der sporadischen Form der AD von einer multifaktoriellen Genese, mit polygenetisch-, umwelt-, und lebensstilbedingten Komponenten ausgegangen (Launer 2002).

Das Gehirn eines AD-Patienten ist makroskopisch durch eine deutliche zerebrale Atrophie gekennzeichnet (Alves, Correia et al. 2012). Die atrophischen Veränderungen weisen ein für das entsprechende Lebensalter atypische Ausprägung auf (Walsh and Selkoe 2004, Perl 2010). Sie betreffen vornehmlich hippocampale sowie frontotemporale Strukturen und sind mit einer Ventrikelerweiterung v.a. des temporalen Horns verbunden (Walsh and Selkoe 2004, Perl 2010). Mikroskopisch lässt sich ein erheblicher Verlust neuronaler Zellen und der weißen Substanz feststellen (Querfurth and LaFerla 2010). Als weitere Veränderungen finden sich Entzündungszeichen, oxidative Schäden und eine kongophile (amyloide) Angiopathie (Querfurth and LaFerla 2010).

Bisherige Studien zu der Erforschung der molekularen Grundlagen der AD-typischen Pathologien konnten zelluläre Dysbalancen wie pro-inflammatorische Reaktionen (Alves, Correia et al. 2012), mitochondriale Dysfunktionen (Reddy 2011) und oxidative Schäden (Cai, Zhao et al. 2011) identifizieren. Eine Vielzahl von Forschungsergebnissen legt nahe, dass der Pathogenese der AD eine Akkumulation fehlgefalteter Proteine im (alternden) Gehirn zu Grunde liegt, welche die genannten zellpathologischen Prozesse initiiert und in einen synaptischen Funktionsverlust und ausgedehnten Untergang neuronaler Zellen mündet (Walsh and Selkoe 2004). Die AD kann demzufolge als häufigste zerebrale „Proteopathie“ bezeichnet werden.

Abnorme Proteinakkumulationen bilden die histopathologischen Charakteristika der AD und sind extrazellulär als Amyloid- β -Plaques und intrazellulär als neurofibrilläre Läsionen aus hyperphosphoryliertem Tauprotein zu finden (Terry 1963, Stelzmann 1995). Eine mögliche Interaktion zwischen A β und Tau sowie der Beitrag dieser Proteine zu Neurodegeneration, Synapsen-, und Nevenzellverlust konnten bisher trotz intensiver Bemühungen noch nicht vollständig erklärt werden (Alves, Correia et al. 2012). Hirnareale wie die kortikalen Regionen für Gedächtnis und Kognition scheinen für genannte Störungen besonders empfänglich zu sein. So kann eine besondere Anfälligkeit von limbischen Arealen, Teilen der assoziativen Cortices und einigen subkortikalen Kerngebieten mit großen kortikalen Projektionsgebieten erklärt werden (Walsh and Selkoe 2004, LaFerla 2010, Perl 2010).

1.2.3.1. Amyloid- β -Protein

Amyloid- β (A β) ist ein im Rahmen der AD zu beobachtendes Protein. Zusammen mit dem Tau-Protein wird es heutzutage maßgeblich für die Pathogenese der AD verantwortlich gemacht. Vor allem das Verständnis der verschiedenen Konfigurationsformen und deren Bedeutung für die Entstehung AD war in den vergangenen Jahren einem deutlichen Wandel unterworfen und ist auch zur Zeit noch nicht vollständig geklärt.

A β -Peptide können aus einer proteolytischen Spaltung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) entstehen (Querfurth and LaFerla 2010). APP gehört zu einer Familie evolutionsgeschichtlich konservierter Typ 1 (singlepass alpha-helikales Transmembranprotein) Membran-proteine (Selkoe 2001). APP kann auf mindestens zwei Wege im Rahmen einer regulierten intermembranären Proteolyse (ROP) gespalten werden: dem amyloiden, sowie dem nicht-amyloiden Weg. Bei dem nicht-amyloiden Weg wird das transmembranäre APP durch eine alpha-Sekretase **innerhalb** der A β -Region gespalten. Diese Spaltung verhindert eine A β -Bildung und resultiert nach einem weiteren Prozessionsschritt in der Freisetzung eines löslichen Teils von APP (soluble APP α , bzw. sAPP α), sowie eines membrangebundenen Fragments (C83) (Lazarov and Marr 2010).

Bei dem amyloiden Weg erfolgt die enzymatische Spaltung des APP durch eine β -Sekretase (β -site APP cleaving enzyme, BACE-1) **außerhalb** der A β -Region (Sinha, Anderson et al. 1999).

Produkt der enzymatischen Prozessierung ist ein lösliches Fragment (sAPP β) und ein membrangebundener Rest (C99) (Lazarov and Marr 2010). Eine nachfolgende Spaltung des membrangebundenen C99 durch eine γ -Sekretase (Presenilin) resultiert in der Entstehung des pathologischen A β und AICD, die in der Pathogenese der AD diskutiert werden. Gebildetes A β hat die Möglichkeit zu aggregieren und in verschiedensten strukturellen Formen (oligomerisch, fibrillär, amyloospheroid u.a.) zu polymerisieren (Querfurth and LaFerla 2010).

Die „Amyloid Hypothese“ macht eine vermehrte Produktion und ein „Ausfallen“ von unlöslichem A β mit folgender Aggregatbildung für die Krankheitsentstehung der AD verantwortlich. Der Hypothese zufolge leitet die Proteinakkumulation eine neurotoxische Kaskade ein, die in einen Synapsen- und Nervenzellverlust mündet, der überwiegend Gehirnareale mit kognitiven Funktionen betrifft (Herrup 2010).

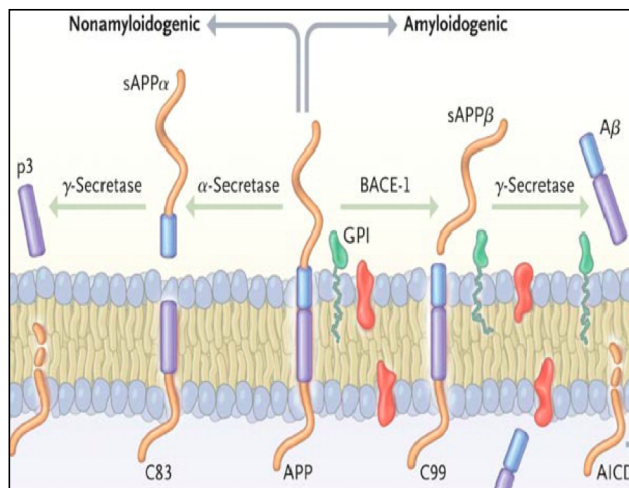


Abbildung 1: Stoffwechselwege des Amyloid-Precursor-Proteins APP (Querfurth und LaFerla, 2010).

1.2.3.2. Tau-Protein

Neben A β -Plaques stellen intraneuronale, neurofibrilläre Läsionen (neurofibrillary tangles, NFT) den zweiten charakteristischen histopathologischen Befund der AD dar (Alves, Correia et al. 2012). Hyperphosphoryliertes und aggregiertes Tau bildet die Hauptkomponente der genannten Komplexe (Querfurth and LaFerla 2010). Zusätzlich zu Tau können Proteine wie Ubiquitin (Perry, Friedman et al. 1987), Cholinesterasen (Mesulam, Geula et al. 1987), sowie das A4 Amyloid-Protein (Hyman, Van Hoesen et al. 1989) als Bestandteil der NFTs nachgewiesen werden.

Tau ist ein zelluläres Protein, das in gelöster Form in großen Mengen in Axonen aufzufinden ist. Axonales Tau trägt unter physiologischen Bedingungen zur Zusammenlagerung und Stabilität von Mikrotubuli bei und nimmt eine wichtige Funktion im Rahmen des axonalen Vesikeltransports ein (Querfurth and LaFerla 2010). In Gehirnen von Patienten mit AD findet sich hyperphosphoryliertes

Tau. In Folge der Hyperphosphorylierung löst sich dieses Tau von den zellulären Mikrotubuli und aggregiert zu unlöslichen neurofibrillären Komplexen (Alves, Correia et al. 2012). Die genannten Veränderungen resultieren in einer Störung axonaler Transportvorgänge sowie intrazellulärer Organellen u.a. auch Mitochondrien (Reddy 2011). Über die genannten Mechanismen üben zelluläre NFTs zytotoxische Effekte aus und entfalten negative Wirkungen auf kognitive Prozesse (Oddo, Vasilevko et al. 2006).

Die Akkumulation von Tau-Proteinen und Amyloid wird durch eine, mit zunehmendem Lebensalter verminderte, Aktivität zellulärer Mechanismen verstärkt. So resultieren vermehrter oxidativer Stress, gestörte Proteinfaltung im endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie ein verminderter Abbau defekter Proteine in Proteasomen und Makrophagen in einer Ansammlung der pathologischen Proteine bei der AD (Hoozemans, Veerhuis et al. 2005).

Inwiefern hierbei die AD-typischen A β -Akkumulationen mit der Tau-Bildung interagieren, sie fördern oder ihnen nachfolgen, konnte bisher noch nicht ausreichend geklärt werden.

1.2.3.3. Dysregulierte Neurogenese

Eine zunehmende Anzahl von Studien zeigt, dass eine Förderung der adulten hippocampalen Neurogenese in einer erheblichen Verbesserung von Prozessen wie Mustererkennung und räumlichem Gedächtnis resultiert (Stone, Teixeira et al. 2011). Eine Abnahme der adulten hippocampalen Neurogenese könnte demzufolge möglicherweise dem kognitiven Abbau im Rahmen des normalen Alterungsprozesses und neurodegenerativer Erkrankungen wie der AD zu Grunde liegen (Lazarov, Mattson et al. 2010).

Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass eine Vielzahl von Molekülen, die an der Pathogenese der AD maßgeblich beteiligt sind, regulatorische Einflüsse auf die adulte Neurogenese ausüben können. Eine modulierende Fähigkeit auf die adulte Neurogenese konnte bisher für ApoE, Presenilin 1 (PS1) sowie APP und dessen Metaboliten nachgewiesen werden (Mu and Gage 2011). Studien von Yang et al. (Yang, Gilley et al. 2011) zufolge, kann nach Ausschaltung des ApoE-Gens eine deutliche Zunahme in der Proliferation neuronaler Vorläuferzellen im murinen GD beobachtet werden. Hippokampale Progenitorzellen in Mäusen mit selektivem knock-out von Presenilin-1, ein mit der familiären Form der AD assoziiertes Gen, demonstrieren eine erheblich gesteigerte Differenzierungsaktivität (Gadadhar, Marr et al. 2011). Ghosal et al. (Ghosal, Stathopoulos et al. 2010) konnten des Weiteren zeigen, dass eine Expression der intrazellulären Domäne von APP (APP intracellular domain, AICD) eine Verminderung der Proliferation und Überlebensraten hippocampaler Vorläuferzellen bewirkt. Die lösliche Komponente von APP α (sog. sAPP α) scheint hingegen fördernde Effekte auf die Neurogenese in der SVZ und SGZ zu haben (Rohe, Carlo et al. 2008).

Mit den genannten Studien existieren zunehmend Hinweise darauf, dass zentrale Moleküle der AD die Entstehungsrate hippocampaler Neuronen beeinflussen können. Alterationen der adulten Neurogenese scheinen hierbei bereits in frühen Lebensjahren, viele Jahrzehnte vor der Erstmanifestation AD-typischer Hirnläsionen oder Neuronenverlust zu erfolgen (Lazarov and Marr 2010, Mu and Gage 2011). Es erscheint somit wahrscheinlich, dass Abänderungen der adulten Neurogenese wechselseitig mit der AD Pathogenese verbunden sind, anstatt lediglich das Resultat einer neuronalen Dysfunktion im Rahmen der AD darzustellen (Mu and Gage 2011) - eine Möglichkeit, die neue Ansatzpunkte für zelluläre Therapien der AD eröffnen könnte.

Faktoren, die bereits als positive Regulatoren der adulten Neurogenese identifiziert werden konnten, könnten in Folge dieser Theorie möglicherweise zur Unterstützung endogener Regenerierungs-, und Genesungsprozesse genutzt werden und somit den Krankheitsverlauf der AD günstig beeinflussen (Mu and Gage 2011). Bisherige Studien, die einen positiven Effekt alternativer Therapiemethoden in der Progression der AD nachweisen, unterstützen diese Hoffnung. So konnten nachgewiesene positive Regulatoren der adulten Neurogenese wie körperliche Betätigung und eine stimulierende Umwelt (Lazarov and Marr 2010) eine Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit in Mausmodellen der AD bewirken (Nichol, Deeny et al. 2009). Studien von Hu et al. (Hu, Xu et al. 2010) und Lazarov et al. (Lazarov, Robinson et al. 2005) konnten darüber hinaus demonstrieren, dass eine komplexe Lebensumgebung eine Reduktion der A β -Level sowie der Ablagerung von Amyloid bewirkt und eine beeinträchtigte Neurogenese wiederherstellen kann.

Die Theorie der alterierten Neurogenese liefert Ansatzpunkte für neuartige Therapieoptionen. Einerseits könnte sie den durch eine Vielzahl von Studien langfristig bekannten, positiven Effekt alternativer Verfahren wie kognitiver Rehabilitation (Clare, Linden et al. 2010), kognitiven Trainings (Yu, Rose et al. 2009) sowie kognitiver Stimulationstherapien (Spector, Thorgrimsen et al. 2003) in der Therapie der AD erklären. Andererseits könnte diese Theorie eine Grundlage für die Entwicklung neuer medikamentöser Therapieformen darstellen, die ihren therapeutischen Effekt durch eine Stimulation der adulten Neurogenese erzielen und somit zu einer verlangsamten Progression der AD beitragen.

1.2.4. Medikamentöse Therapieoptionen

Trotz intensivster Forschungsbemühungen konnte bisher noch keine medikamentöse Therapieform etabliert werden, die sich spezifisch gegen die zu Grunde liegende Pathologie der Alzheimer-Erkrankung richtet (Corbett, Smith et al. 2012). Etablierte medikamentöse Therapien der AD erzielen ihre Effekte vorrangig durch die Beeinflussung des cholinergen und glutamatergen Stoffwechsels (Corbett, Smith et al. 2012). Aufgrund eines Verlustes cholinergischer Neuronen des

basalen Vorderhirns ist das cholinerge System des ZNS bereits in frühen Stadien der AD vermindert aktiv (Perry, Perry et al. 1977).

In Deutschland sind derzeit drei Acetylcholinesterase-Inhibitoren (AChEI) Rivastigmin, Galantamin sowie Donepezil zur Behandlung der milden bis mäßigen Erkrankungsstadien der AD zugelassen. Memantine, ein Wirkstoff mit Beeinflussung des glutamatergen Systems (NMDA Rezeptor Antagonist) findet derzeit v.a. in der Behandlung von Patienten mit mäßigen bis schweren Erkrankungsstadien der AD Anwendung (Corbett, Smith et al. 2012). Sowohl AChEIs als auch Memantine erzielen einen mäßigen symptomatischen Effekt und sind im klinischen Alltag kosteneffektiv einsetzbar (Corbett, Smith et al. 2012).

Es besteht die Hoffnung, durch eine zeitnahe Entwicklung spezifischerer Therapieansätze die Behandlung von Patienten mit AD in der Zukunft zu optimieren und eine längerfristige Verbesserung der Kognition und Lebensqualität zu ermöglichen. Neben der Entwicklung neuartiger Therapieformen besteht hierbei ein großes Potential in der „Neuinterpretation“ bestehender, für andere Krankheitsentitäten bereits zugelassener Medikamente.

Als ein wichtiger Ansatz für die Entwicklung zukünftiger Medikamente gilt die Modifikation bzw. Inhibition der β - und γ -Sekretase. Von Therapeutika mit diesem Wirkmechanismus erhofft man sich eine Verminderung der Produktion von A β sowie der möglichen Entstehung von zytotoxischen A β -Plaques (Corbett, Smith et al. 2012). Thiazolid-Antidiabetika wie Rosiglitazon und Pioglitazon sind eine Gruppe von klinisch etablierten Wirkstoffen mit nachgewiesener Wirksamkeit auf die AD-relevante β -Sekretase (Corbett, Smith et al. 2012). Bisherige randomisierte klinische Studien konnten jedoch für diese Wirkstoffklasse, ebenso wie für Modulatoren der γ -Sekretase keine oder lediglich mäßig positive Effekte in der Behandlung der AD nachweisen (Green, Schneider et al. 2009).

Neben der Modifikation des Amyloid-Stoffwechsels wird pathologisches Tau als Zielstruktur möglicher therapeutischer Verfahren diskutiert (Corbett, Smith et al. 2012). Sowohl Valproat als auch Lithium sind etablierte Wirkstoffe in der Therapie neurologisch-psychiatrischer Krankheitsbilder und haben nachgewiesene Effekte auf das Enzym GSK-3, einem Schlüsselenzym in der Phosphorylierung von Tau (Corbett, Smith et al. 2012). Randomisierte Studien zur Ermittlung der Wirksamkeit in der AD zeigten für Valproat unerwünschte, da fördernde Effekte auf die Progression der Erkrankung (Tariot, Schneider et al. 2011). Studien mit Lithium konnten jedoch in Tierversuchen und Voruntersuchungen an Menschen eine positive Wirkung demonstrieren (Leroy, Ando et al. 2010).

Methylenblau (MB) stellt einen weiteren, medizinisch etablierten Wirkstoff dar, der in den letzten Jahren zunehmend in der Therapie der AD diskutiert wurde. Der in MB enthaltene Wirkstoff Methyliniumchlorid findet seit 1891 klinische Anwendung (Guttmann 1891). In den vergangenen Jahrzehnten wurde MB in der Therapie manischer Depressionen und Harnwegsinfektionen, sowie

einer Vielzahl weiterer medizinischer Indikationen verwendet (Gura 2008). In der Mitte der 1980 Jahre konnte Wischik bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen beobachten, dass ein zum Anfärben zellulärer Strukturen verwendeter, blauer Farbstoff die Auflösung intrazellulärer Tau-Filamente bewirken konnte (Gura 2008). Ein Jahrzehnt später gelang es Wischik mit *in vitro* Experimenten zu demonstrieren, dass MB Interaktionen zellulärer Tau-Moleküle unterbinden kann (Wischik, Edwards et al. 1996). Wischik propagierte auf Grundlage dieser Forschungsergebnisse ein mögliches Potential von MB in der medikamentösen Therapie der Alzheimer Demenz (Wischik, Edwards et al. 1996). 2008 stellte er beim jährlichen Treffen der Alzheimer Gesellschaft in Chicago Studienergebnisse seiner Arbeitsgruppe zu dieser Fragestellung vor (Gura 2008). Aussagen von Wischik zufolge, konnte die an 321 Patienten mit AD durchgeführte Studie nach 6-monatiger Therapie mit MB eine signifikante Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit im Vergleich zur Placebogruppe nachweisen (Gura 2008). Benigne Effekte einer systemischen Therapie mit MB wie u.a. Blaufärbung des Urins und der Skleren bedingten jedoch Schwierigkeiten bei der Verblindung und folglich der einwandfreien Interpretation dieser vielversprechenden Studienergebnisse (Corbett, Smith et al. 2012).

MB wird seine möglicherweise positiven Einflüsse auf den Verlauf der AD in vielen weiteren Studien beweisen müssen, bevor eine breite klinische Anwendung bei dieser Indikation denkbar ist. Dennoch stellt der jahrzehntelang in klinischer Anwendung befindliche Wirkstoff MB zur Zeit neben innovativen Ideen wie u.a. krankheits-modifizierenden Agenzien oder Immunotherapien (soz. „Impfungen“) einen der Hoffnungsträger für die Therapie der AD in der Zukunft, dar.

1.3. Methylenblau

1.3.1 Historischer Überblick

Die Entdeckung von Methylenblau (MB) reicht über 120 Jahre zurück (Schirmer, Adler et al. 2011). Im 19. Jahrhundert bewirkte der schnelle Aufstieg der Textilindustrie ein zunehmendes Interesse an der Entwicklung und Erforschung von künstlichen Farbstoffen zur Färbung der industriell verwendeten Materialien (Oz, Lorke et al. 2011). 1876 entwickelte Heinrich Caro von der Badischen Anilin- und Sodafabrik (BASF) Methylenblau, einen Farbstoff auf der Grundlage des Anilins (Wiklund, Basu et al. 2007, Oz, Lorke et al. 2011). Innerhalb kurzer Zeit wurden weitere Anwendungsmöglichkeiten von MB erkannt, sodass MB in den 1890iger Jahren Einzug in naturwissenschaftliche Laboratorien erhielt (Wiklund, Basu et al. 2007).

MB fand zunächst Verwendung in der Anfärbung zellulärer Strukturen. Bald erkannten Forscher, dass die selektive Anreicherung MBs in Pathogenen wie Bakterien und Parasiten neben der morphologischen Untersuchung auch einer selektiven Elimination der Erreger und der von ihnen hervorgerufenen Erkrankungen dienen könnte (Oz, Lorke et al. 2011). 1891 konnte Paul Ehrlich erstmals demonstrieren, dass MB effektiv zu der Bekämpfung des Malariaerregers Plasmodium

falciforme beitragen kann und etablierte MB in der Malariatherapie (Guttmann 1891). MB war somit das erste nicht-natürliche Antiseptikum im medizinischen Gebrauch und die erste voll synthetische Verbindung, die in der Medizin Anwendung fand (Wainwright and Crossley 2002).

Im weiteren Verlauf diente MB als wichtige Grundlage u.a. für die Entwicklung weiterer antimikrobieller sowie antineoplastisch wirksamer Pharmaka (Wainwright 2003).

Bedingt durch eine hohe Affinität zu Nervengewebe und unselektive Bindung an motorische, sensorische und autonome Nervenfasern konnte MB auch der neurologischen Forschung zu wichtigen Erkenntnissen verhelfen (Kristiansen 1989). Färbungen mit MB waren unter anderem beteiligt an Cajal's Neuronen-Theorie (Garcia-Lopez, Garcia-Marin et al. 2007), der Untersuchung von motorischen Endplatten (Coers 1952) und Untersuchungen an Ranvier'schen Schnürringen (Muller 1952). MB diente des Weiteren als Grundlage für die Entwicklung der Phenothiazine, einer umfangreichen Klasse von Pharmaka, die auch heutzutage als Antihistaminika und Neuroleptika Anwendung finden (Kristiansen 1989). MB lieferte somit einen essentiellen Beitrag zu der Entwicklung neuer Therapieformen im Bereich der neurologisch-psychiatrischen Krankheitsbilder. Während die Potenz in der Therapie psychotischer Krankheitsbilder seit mehr als einem Jahrhundert genutzt wird, ist innerhalb der letzten Jahre vor allem durch Untersuchungen von Wischik et al. ein mögliches Potential von MB zur Verlangsamung von kognitiven Defiziten im Rahmen dementieller Erkrankungen zunehmend in das Zentrum des allgemeinen Interesses gerückt (Gura 2008).

1.3.2. Pharmakologische Eigenschaften

Methylenblau (Tetratetramethylthioninchlorid, $C_{16}H_{18}ClN_3S$, Molekulargewicht: 319,86) ist ein heterozyklischer aromatischer Farbstoff aus der Gruppe der trizyklischen Phenothiazine (Wainwright and Amaral 2005). Unter physiologischen Bedingungen bildet MB einen Teil eines Redox-Systems. Innerhalb dieses Systems stellt Methylenblau die oxidierte Form und das durch Interaktion von MB mit Redoxsystemen z.B. in Erythrozyten und peripheren Geweben entstehende Leukomethylenblau (LeukoMB) die reduzierte Form, dar (DiSanto and Wagner 1972). Durch eine starke Absorption von Licht in den Wellenlängenbereichen 609 und 668 nm erscheint die oxidierte Form tiefblau (Ramsay, Dunford et al. 2007). Die reduzierte Form absorbiert kein Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich und erscheint farblos („Leuko“) (Lee and Mills 2003). Die Redox-Eigenschaften von Methylenblau werden im klinischen Gebrauch vor allem in der Therapie der Methämoglobinämie, sowie in der Behandlung der Ifosfamid-induzierten Enzephalopathie genutzt (Schirmer, Adler et al. 2011).

Grundsätzlich ist MB ein sehr gut verträgliches Medikament, das in der klinischen Anwendung sicher ist (Riha, Bruchey et al. 2005). Spezifische Nebenwirkungen und Toxizitäten von MB sind durch eine jahrzehntelange Erfahrung im klinischen Gebrauch (v.a. in der langjährigen Therapie von Individuen mit hereditärer Methämoglobinämie) gut bekannt. Durch *in vitro* Studien konnte

ein sehr großes therapeutisches Wirkspektrum in Konzentrationsbereichen von ca. 0.1nM bis 10µM festgestellt werden, toxische Effekte wurden ab Dosierungen von mehr als 100µM beschrieben (Oz, Lorke et al. 2009). Studien von Wagner et al. (Wagner, Skripchenko et al. 1998) zufolge können Konzentrationen größer 10µM zu einer Bildung intrazellulärer Dimere führen und somit zytotoxische Wirkungen entfalten.

MB wird zu therapeutischen Zwecken vorwiegend oral oder intravenös appliziert, aber auch intraossäre Verabreichungen wurden beschrieben (Clifton and Leikin 2003). Nach i.v. Gabe hat MB eine terminale Plasma-Halbwertszeit von ca. 5-7 Stunden, die Bioverfügbarkeit liegt bei ca. 73% (Peter, Hongwan et al. 2000, Walter-Sack, Rengelshausen et al. 2009). Abhängig von Applikationsform und Präparat liegt die empfohlene therapeutische Dosis zwischen 1-4mg /kg Körpergewicht (Clifton and Leikin 2003). Das Muster der Gewebsverteilung von MB scheint hierbei maßgeblich von der Applikationsform abhängig zu sein (Clifton and Leikin 2003). Experimente durch Peter et al. konnten zeigen, dass eine orale Verabreichung eine vorwiegende Anreicherung in Darm und Leber von Ratten bewirkt, wohingegen eine intravenöse Applikation zu einer multikompartmental Verteilung mit besonderer Akkumulation im Hirngewebe führt (Peter, Hongwan et al. 2000). Für die Anwendung bei neurologisch-psychiatrischen Indikationen ist darüber hinaus relevant, dass MB in seiner reduzierten Form sehr effizient die Blut-Hirn-Schranke (BHS) überwinden kann. Eine Fähigkeit, die Untersuchungen von Peter et al. und Walter-Sack et al. zufolge unabhängig von der Art der Applikation (intravenös, intraperitoneal, intraduodenal) zu sein scheint. (Peter, Hongwan et al. 2000, Walter-Sack, Rengelshausen et al. 2009). Im Anschluss an die Passage der BHS zeigt Methylenblau eine ausgeprägte Anreicherung in bestimmten Nervenzelltypen (Muller 1998). Unter anderem fielen besonders starke Färbungen in nicht-pyramidalen Zellen (z.B. intrinsische Interneurone) im Stratum pyramidale und Stratum oriens des murinen Hippokampus auf (Muller 1998). Diese besondere Affinität zu Nervengewebe könnte erklären, weshalb eine Vielzahl der unerwünschten Wirkungen von MB neurologisch-psychiatrischer Genese ist.

Mögliche Nebenwirkungen von MB treten dosisabhängig auf und konnten bisher (unter Beachtung der Kontraindikationen) ab Konzentrationen größer 2mg/kg Körpergewicht beobachtet werden (Oz, Lorke et al. 2009). Eine Dosierung, die im klinischen Alltag selten erreicht wird (Oz, Lorke et al. 2009). 1983 beschrieb Harvey vielfältige Nebenwirkungen im Anschluss an eine Applikation hoher intravenöser Konzentrationen (>7mg/kg), wobei unter anderem Übelkeit, Zyanose, Cephalgien und Verwirrungszustände beobachtet werden konnten. (Harvey and Keitt 1983).

In therapeutisch zur Anwendung kommenden Wirkstoffkonzentrationen ist als häufige Nebenwirkung v.a. eine grün-blaue Verfärbung des Urins und der Skleren zu beobachten. Ein benigner Effekt, der innerhalb weniger Tage nach Beendigung der Therapie spontan remittiert (Oz, Lorke et al. 2009). Eine wichtige Kontraindikation für den Gebrauch von MB ist auf dessen Beeinflussung des Serotonergen Systems zurückzuführen. Durch eine Erhöhung der zentralen

Serotoninkonzentrationen kann MB bei Patienten mit Einnahme von Antidepressiva des SSRI-Typs (selektive Serotonin Reuptake-Inhibitoren) zu einer, dem zentralen Serotonin Syndrom ähnlichen, Symptomatik mit Tremor, Krämpfen, Nystagmus, Mydriasis, Agitation, erhöhter Transpiration und Erröten, führen (Bach, Lindsay et al. 2004). Daher ist MB für Patienten, die SSRIs einnehmen, kontraindiziert (Ramsay, Dunford et al. 2007).

1.3.3. Molekulare Zielstrukturen

Die niedrige Toxizität, die Fähigkeit zelluläre Membranen zu durchdringen und die BHS zu passieren, macht MB zu einem attraktiven therapeutischen Agens (Oz, Lorke et al. 2011). MB beeinflusst eine große Anzahl von Zielstrukturen. Viele der Effekte scheinen hierbei eng mit den besonderen physiochemischen Eigenschaften wie dem Redoxpotential, Ladungen und Lichtabsorption/-anregbarkeit assoziiert zu sein (Oz, Lorke et al. 2011).

Eine gute Permeabilität durch die BHS und die Affinität zu Nervengewebe bedingt, dass MB zusätzlich zu Wirkungen auf überwiegend „peripher“ lokalisierte Zielstrukturen wie der NO-Synthase (Mayer, Brunner et al. 1993), Guanylylzyklase (Gruetter, Kadowitz et al. 1981), Methämoglobin und Glutathionreduktase (Harvey, Duvenhage et al. 2010) auch in physiologische Prozesse des Nervensystems involviert ist. Im zentralen und peripheren Nervensystem beeinflusst MB durch Effekte auf das cholinerge (Pfaffendorf, Bruning et al. 1997), monoaminerge (Ramsay, Dunford et al. 2007) und glutamaterge (Vutsikits, Briner et al. 2008) System vielfältig neuronale Signalprozesse. Eine Modulation der Funktion von spannungsabhängigen Na⁺ (Kress, Petersen et al. 1997), Ca²⁺ (Thuneberg 1990) und Ca²⁺ aktivierten K⁺-Kanälen (Nemeth, Daly et al. 1985) erklärt des Weiteren eine Veränderung der neuronalen Erregbarkeit unter MB Gabe.

Unter den vielfältigen neuro-zellulären Mechanismen, die durch MB beeinflusst werden, befinden sich auch jene, die aktuell im Rahmen der Pathogenese der Alzheimerdemenz diskutiert werden.

Schon seit einiger Zeit ist bekannt, dass strukturverwandte Stoffe des MB eine Affinität zu Tau-Filamenten haben (Mena, Edwards et al. 1995). Eine Eigenschaft, die in den vergangenen Jahren eine zunehmende Diskussion der Anwendung von „Thiazine-Red“ und anderer verwandter Stoffe in der post-mortem Schnellschnittdiagnostik der AD bewirkt hat (Luna-Munoz, Peralta-Ramirez et al. 2008).

Aus der Beobachtung, dass MB sowie einige demethylierte Abkömmlinge (Azur A/B, Toloniumchlorid) in der Lage sind, den proteolytischen Abbau von intrazellulären Tau-Fibrillen *in vitro* zu verstärken (Wischik, Edwards et al. 1996) und eine Hemmung einer heparin-induzierten Bildung von Tau-Fibrillen *in vitro* bewirken (Taniguchi, Suzuki et al. 2005), schlussfolgerte Wischik (Wischik and Staff 2009), dass MB in der pharmakologischen Therapie der AD effektiv sein könnte. Studien dieser Fragestellung geben Anhalt dafür, dass MB die kognitive Funktionsfähigkeit von Alzheimerpatienten verbessern kann (s.o.) (Sullivan 2008, Oz, Lorke et al. 2009, Wischik and Staff 2009).

Die Wirkung auf intrazelluläres Tau wurde zunächst maßgeblich zur Erklärung der geschilderten Effekte herangezogen. Nachfolgende Forschungsarbeiten konnten jedoch eine Vielzahl weiterer Mechanismen von MB identifizieren, die zu der beobachteten Wirkung in Patienten mit AD beitragen könnten. So wird aktuell auch eine Beeinflussung der Formation von Amyloid-Plaques durch MB vermutet, obwohl zur Zeit vorliegende Studien zu diesem Thema widersprüchliche Ergebnisse zeigen. Bisher konnte sowohl eine Verminderung als auch ein Anstieg in der Plaqueformation beobachtet werden (Necula, Breydo et al. 2007). Auch eine Hemmung der Acetylcholinesterase (AChE) durch MB konnte mit Hilfe aktueller Studien nachgewiesen werden (Augustinsson and Nachmansohn 1949). Durch die hemmende Eigenschaft trägt MB zu einer verstärkten Aktivität des cholinergen Systems bei. Ein Effekt, der ebenfalls durch die aktuell etablierteste Therapieform der AD, den AChEI erzielt wird.

1.4. Aufgabenstellung

Der Morbus Alzheimer ist eine progressive neurologische Erkrankung mit steigender Inzidenz in den Ländern der westlichen Welt. Die ausgeprägte volkswirtschaftliche Relevanz der Alzheimer Demenz macht eine wissenschaftliche Erforschung der Pathogenese sowie die Entwicklung neuer Therapiestrategien dringend erforderlich. Neben bekannten Mechanismen wie der Akkumulation von Tau-Filamenten und Amyloid- β -Plaques wird eine Dysregulation der adulten Neurogenese zunehmend in der Pathogenese der Alzheimer Demenz diskutiert.

Methylenblau ist ein medizinisch langjährig etablierter Wirkstoff. Neben bekannten klinischen Indikationen hat Methylenblau in den vergangenen Jahren große Hoffnungen bezüglich einer therapeutischen Anwendung im Rahmen der Alzheimererkrankung geweckt. Durch Ergebnisse aktueller Studien konnten in den vergangenen Jahren vielfältige Wirkmechanismen identifiziert werden, welche die ursprünglich vermuteten Potentiale Methylenblaus weit übertreffen.

Diese Arbeit befasst sich mit den zellulären Verhaltensweisen adulter neuronaler Stammzellen. Es wird der Frage nachgegangen, ob eine Behandlung mit Methylenblau das Verhalten adulter neuronaler Stammzellen der Maus beeinflussen kann. Hierbei werden charakteristische Fähigkeiten adulter neuronaler Stammzellen wie u.a. Proliferation (Kurz-, sowie Langzeit) und Migration untersucht. Des Weiteren wurden die Expressionsraten zweier „Neurogenese-assoziierten“ Gene: BDNF (Zigova, Pencea et al. 1998, Benraiss, Chmielnicki et al. 2001, Pencea, Bingaman et al. 2001) und TPH-2 (Benninghoff, Gritti et al. 2010) erhoben. Die Bestimmungen der relativen Expression von BACE-1 und Synaptophysin erlaubten darüber hinaus stellvertretend Aussagen über 2 der derzeit meistdiskutierten Pathomechanismen der AD: der Produktion von Amyloid β (LaFerla and Oddo 2005) sowie einer Einschränkung der synaptischen Plastizität (Arendt 2009) (weitere Informationen zur Auswahl der Genes of Interest s. Abschnitt 3.4.3.1. - 3.4.3.4. im Ergebnisteil).

Material und Methoden

2.1. Adulte neuronale Stammzellen (ANSC)

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Zellen handelte es sich um neuronale Stammzellen aus dem Hippokampusareal adulter Mäuse (Alter: 14 Wochen; Charles River Laboratories, Italien). Die Zellgewinnung erfolgte im Vorfeld der Arbeit nach einem von Gritti, Galli und Vescovi beschriebenen Verfahren im Stem Cell Research Institute in Mailand (Gritti 2001). Hierbei wurden die entsprechenden gesetzlichen Reglementierungen (Italien) für die Organentnahme (Hippokampus) am toten Tier berücksichtigt. Zur Gewinnung einer für die weitere Kultivierung ausreichenden Zellmenge war die Kombination der extrahierten Gehirnareale von mehreren Mäusen (2-3) erforderlich. Die gewonnenen Zellen wurden noch im Stem Cell Research Institute in einer „Frosting Solution“ aus Vollmedium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) kryokonserviert. Sie gelangten in diesem Zustand an das Labor der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU München in dem die im folgenden Text geschilderten Untersuchungen durchgeführt wurden.

2.1.1. Dissektion des Hippokampusareals

Die im Folgenden erläuterten Schritte der Tötung sowie der Gewebdissektion fanden außerhalb der sterilen Werkbank statt.

Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Phenobarbital anästhesiert (120mg/kg) und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Unmittelbar kranial des Übergangs in die Halswirbelsäule wurde der Kopf mit einer Schere abgetrennt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Die Schädelhaut wurde medial durch einen kaudo-rostralen Schnitt eröffnet und vollständig entfernt. Mit einer kleinen Schere wurde der Schädel entlang der sagittalen Suture longitudinal eröffnet und die Hemisphären durch eine gebogene Pinzette nacheinander freigelegt. Das Gehirn wurde entnommen und in eine Petrischale mit PBS gelegt. Durch anschließendes Überführen in zwei weitere, mit PBS gefüllte Petrischalen wurde das Gehirn gewaschen.

Für die Dissektion des gewünschten Hirnareals wurde das Gehirn unter einem Präpariermikroskop (10-fache Vergrößerung) platziert. Unter einer 25-fachen Vergrößerung erfolgte anschließend eine weitere Präparation des Hippokampusareals. Das übrige Hirngewebe wurde verworfen.

2.1.2. Dissoziation des Hirngewebes und Primärkultur

Die sich an die Gewebdissektion anschließenden Schritte erfolgten, soweit nicht anders vermerkt, unter der sterilen Werkbank.

Für die Dissoziation des Gewebes wurden die zuvor präparierten Hippokampusareale mit einer kleinen Schere zerschnitten. Die Fragmente der Hippokampi von zwei bis maximal drei Mäusen wurden in jeweils ein 15ml Röhrchen überführt, das zuvor mit 14ml einer Papain-DNase Lösung (0.5ml 0.1% DNase Stock in 13.5 ml Papain-Lösung) befüllt worden war. Das Röhrchen wurde auf

einem Rüttler platziert und 30-60 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an die enzymatische Zersetzung erfolgte eine zehnminütige Sedimentation des verdauten Gewebes bei 600rpm. Der zellfreie Überstand wurde bis auf einen kleinen Rest entfernt. Es wurden 3ml einer Lösung aus Kulturmedium und 0.7mg/ml Ovomucin hinzugefügt. Mit einer sterilen Pasteur-Pipette wurde 20-30mal resuspendiert und das Sediment somit weitestgehend zersetzt. Es folgte erneut eine zehnminütige Sedimentation bei 600rpm. Im Anschluss an eine bis auf ca. 200µl vollständige Entfernung des zellfreien Überstands wurde 20-25mal resuspendiert und das Pellet aufgelöst. Anschließend wurden 5ml des Kulturmediums addiert und die Zellen 15min bei 150rpm sedimentiert. Nach einer vollständigen Entfernung des Überstands wurden die Zellen in 0.5ml des Kulturmediums resuspendiert. Anschließend wurden 10µl der Zelllösung entnommen und zum Zählen in eine Trypanblau-Lösung (1:2 Verhältnis) überführt.

Für die Primärkultur wurden die Zellen in einer Dichte von 3500 lebenden Zellen pro cm² in Kulturmedium ausgesät. Als Kulturgefäße dienten wahlweise 6-Multiwell Kulturplatten (2ml Volumen) oder 25-cm² Kulturflaschen (6ml Volumen). Die Zellen wurden 5-10 Tage (abhängig von den im Kulturmedium enthaltenen Wachstumsfaktoren) bei 37°C, 5% CO₂ bis zum Erreichen der Subkonfluenz inkubiert. Die gewonnenen Zellen wurden im Anschluss an die Proliferation im Kulturmedium in einer „Frosting Solution“ aus Vollmedium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) eingefroren. Dieser Arbeitsschritt erfolgte noch im Stem Cell Research Institute in Mailand.

2.1.3. Kultivierung der ANSC

2.1.3.1. Grundlagen

Für nachfolgende Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit war primär die Gewinnung einer Kultur von murinen ANSC aus dem Hippokampusareal erforderlich. Essentiell war hierbei zu beachten, dass die im Vorfeld geschilderten Arbeitsschritte eine Selektivität hinsichtlich der Hirnregion nicht aber hinsichtlich des gewünschten Zelltyps gewährleisten konnten. Eine möglichst effektive Separierung der ANSC von, in der Primärkultur ebenfalls vorhandenen, ausdifferenzierten Zelltypen (Gliazellen, Neurone) wurde erforderlich.

Durch Berücksichtigung spezifischer Wachstumsbedingungen (niedrige Zelldichte von ca. 5×10^4 Zellen/cm², Abwesenheit von Serum, Vorhandensein bestimmter Wachstumsfaktoren im Kulturmedium (Epidermal Growth Factor (EGF), und/oder Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2)), sowie die Abwesenheit einer stark zelladhäsiv wirkenden Substanz) war es möglich, eine selektive Zellkultur herzustellen, bei der ein Großteil der primär differenzierten Zellen des ZNS frühzeitig (erste 2-3 Tage) untergingen. Die in der Zellkultur enthaltenen, undifferenzierten Stammzellen begannen unter genannten Konditionen aktiv zu proliferieren. Durch Anheftung der Tochterzellen an die proliferierende Zelle konnte im weiteren Verlauf das Entstehen sphärischer Zellkonglomerate, sog. Neurosphären, beobachtet werden. Die größere Masse und die Kugelform

bedingen, dass sich die Neurosphären von dem Grund der Platte lösten und sich frei in Suspension befanden.

Eine frühzeitige, spontane Differenzierung der Tochterzellen ergab, dass pro Neurosphäre ein Prozentsatz von ca. 80-90 % der Zellen Charakteristika einer Stammzelle aufwies. Der restliche Teil der Neurosphäre wurde von differenzierenden Vorläuferzellen, sowie ausdifferenzierten Neuronen und Gliazellen gebildet. Um auch im weiteren Verlauf eine möglichst selektive Kultivierung der ANSC zu gewährleisten, war eine regelmäßige Separation der Neurosphären und Subkultivierung der darin enthaltenen Zellen (im Folgenden Passage genannt) erforderlich. Unter Berücksichtigung der im vorangehenden Text erläuterten Wachstumsbedingungen war es in der Subkultur erneut möglich, eine intensivere Proliferation der ANSC herbeizuführen. Die genannte Prozedur konnte viele Male hintereinander durchgeführt werden. Da eine ANSC bis zur Bildung einer Neurosphäre zahlreiche weitere ANSC generierte, konnte von einem exponentiellen Anstieg der in Kultur befindlichen neuronalen Stammzellen ausgegangen werden.

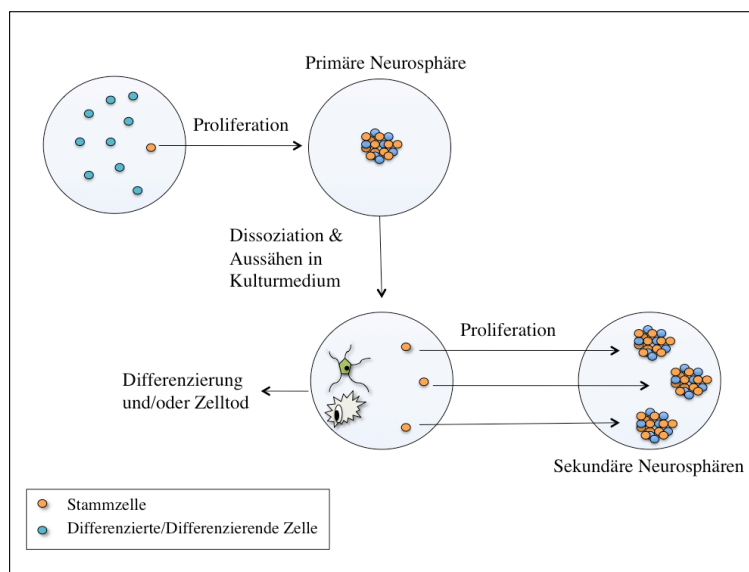


Abbildung 2: Grundlagen der Proliferation und Expansion adulter neuronaler Stammzellen *in vitro* (modifiziert nach Gritti et al. (Gritti 2001))

2.1.3.2. Passage der ANSC

Die Passage erfolgte in einem von Gritti, Galli und Vescovi beschriebenen Verfahren (Gritti 2001). Die Zellen der Kultur wurden alle 3-4 Tage in der im Folgenden erläuterten Prozedur passagiert.

Vorbereitung - Vor der Passage wurden die Kulturschalen dem Inkubator entnommen und die darin enthaltenen Zellen unter dem Mikroskop bezüglich ihres Wachstums und ihrer Morphologie

beurteilt. Um sterile Bedingungen zu gewährleisten, wurden alle darauf folgenden Arbeitsschritte unter der Arbeitsbank durchgeführt.

Die Zellen wurden mit einer Pipette aus der Kulturschale aufgenommen und in ein Röhrchen überführt. Der Grund der Schale wurde mehrmals mit der Pipettenflüssigkeit überspült, um die dort haftenden Zellen bei der Passage zu erfassen. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei 800rpm und 21°C zentrifugiert und bildeten anschließend ein weißliches Sediment.

Dissoziation - Der zellfreie Überstand von ca. 10ml wurde mit einer an eine Vakuumpumpe angeschlossenen sterilen Glas-Pasteur-Pipette bis auf 300µl abgesaugt. Um eine Vereinzelung der im Sediment befindlichen Zellen zu erreichen, wurde dieses in den verbleibenden 300µl Nährmedium ca. 40-50 Mal resuspendiert und die Zellen weitgehend dissoziiert. Anschließend wurden 700µl Vollmedium zugefügt und erneut resuspendiert.

Quantifizierung - Zur Quantifizierung der in der Suspension befindlichen Zellen wurden 10ml Zählpuffer abgefüllt. 10µl der Zellsuspension wurden entnommen und im Zählpuffer verteilt. Die in der Lösung befindliche Zellmenge wurde mit Hilfe eines Zellzählers bestimmt. Zum Erfassen der neuronalen Stammzellen wurde ein Messbereich von 9-19µm gewählt. Die nach drei Messungen gemittelten Zählergebnisse bildeten die Grundlage für die rechnerische Bestimmung der für die weiteren Experimente bzw. Subkultivierung zu verwendenden Menge an Zellsuspension. Alternativ zum Zellzähler wurde eine Neubauer Zählkammer zur Bestimmung der Zellzahlen verwendet.

Einbringen in das Kulturmedium - 750.000 Zellen aus der Zellsuspension wurden in eine mit 10ml Vollmedium befüllte Kulturschale überführt. Für eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Kulturmedium wurde die Kulturschale wenige Male vorsichtig geschwenkt und anschließend in den Inkubator gestellt. Die Zellen verblieben bis zum Erreichen der Subkonfluenz für 3-4 Tage bei 37°C und 5.0% CO₂ im Inkubator und wurden dann erneut subkultiviert bzw. passagiert.

2.2. Testsubstanz

Als zu untersuchende Substanz wurde in dieser Arbeit Tetramethylthioninchlorid ($C_{16}H_{18}ClN_3S$, CAS-Nr. 7220-79-3, im Folgenden MB) gewählt. Aufgrund des für die Zellkultur ungeeigneten Ethanolanteils in der bereits gelösten Form wurde ein pulverisiertes Präparat mit einem Farbstoffanteil von >82% verwendet.

Vorbereitung der Methylenblau-Lösung - Bei der Vorbereitung der Experimente wurde eine „Stock-Solution“ (1mM) vorbereitet in der das pulverisierte MB für die weitere Verwendung in DMEM gelöst wurde. Um die Löslichkeit der Lösung zu erhöhen, wurde die vorbereitete Stock Solution im Anschluss an ein ausführliches Mischen 5 min in ein Ultraschallbad gelegt. Die Verbesserung der Löslichkeit ermöglichte eine Minimierung der Farbrückstände, die sich bei einer im Anschluss folgenden sterilen Filtration ergaben. Aus der filtrierte Lösung wurde unmittelbar

vor den entsprechenden Versuchen Verdünnungen in den erforderlichen Konzentrationen angesetzt.

Ermittlung der Toxizitätsgrenze - Vor der Verwendung des MB im Rahmen der weiteren Experimente wurde die zellspezifische Toxizitätsgrenze ermittelt. Die höchste, nicht mehr toxische Konzentration an MB war der maßgebliche Wert für die in den weiteren Experimenten verwendeten Konzentrationen. Zur Bestimmung der Toxizitätsgrenze wurde ein Zellvitalitätstest nach dem „Alamar-Blue®“-Protokoll verwendet. Das dem „Alamar-Blue“-Vitalitätstest zu Grunde liegende Prinzip besteht in der Erfassung der vitalitätsabhängigen Reduktionskraft der untersuchten Zellen. Das in dem „Alamar Blue Reagent“ enthaltene Resazurin wird durch natürliche, zelluläre Reduktionsprozesse je nach Vitalität in unterschiedlichem Ausmaß in Resurofin umgewandelt. Die Farbänderung, die mit der Reduktion des blauen Resazurins zum rötlichen Resurofin einhergeht, kann photometrisch bzw. fluoreszenzmikroskopisch erfasst und quantifiziert werden. Die ermittelten Werte ermöglichen Rückschlüsse auf die Reduktionskraft der untersuchten Zellen und somit deren Vitalität, wobei eine verringerte Vitalität mit einer Reduktion der zellulären Reduktionskraft einhergeht.

Die Versuchsauswertung erfolgte anhand der bei der photometrischen Messung gewonnenen Absorptionswerte. Durch den Vergleich mit den Absorptionswerten einer Positivkontrolle (ANSC ohne Zusatz von MB) konnte für jede der MB-haltigen Testkonzentrationen eine Aussage über ihre Beeinflussung der Zellvitalität gemacht werden. Die niedrigste MB-Konzentration, bei der die Absorptionswerte im Vergleich zur Positivkontrolle noch abnahmen, wurde als toxische Schwellenkonzentration festgelegt.

Da MB in einem dem Resazurin sehr ähnlichen Wellenlängenbereich absorbiert (s.o.), musste für eine Vergleichbarkeit aller Proben der Absorptionsanteil des MB an der jeweiligen Gesamtabsorption ermittelt werden (erfolgte in dieser Arbeit durch zusätzliche Kontrollen). Unter Berücksichtigung der genannten Vorraussetzungen konnte im Rahmen dieser Arbeit eine deutliche Abnahme der zellulären Reduktionskraft bei MB-Konzentrationen zwischen 1µM und 10µM registriert werden. Eine Konzentration von 1µM wurde zunächst als höchste, nicht mehr toxische Menge an MB festgelegt. In drei anschließenden, jeweils 28-tägigen Wachstumskurven zur Bestätigung der ermittelten Toxizitätsgrenze wurde ein signifikant vermindertes Wachstum der ANSC bei einer Kultivierung in 1µM MB-Medium im Vergleich zur MB-freien Kontrolle beobachtet. Für die weiteren Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurde aufgrund dessen eine Testkonzentration von 100nM MB gewählt.

2.3. Long Term Proliferation

Die Long-Term-Proliferation diente der Erfassung des Langzeit-Wachstums der ANSC unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Als Medien dienten Vollmedium mit 100nM MB, sowie reines Vollmedium (MB-Anteil durch Zugabe von DMEM ersetzt) als Kontrolle.

Der Ablauf sowie die Kulturbedingungen dieses Versuchs waren an die der regulären Passage angelehnt (s.o.). Durch den Vergleich der Zellzahlen der verschiedenen Ansätze konnten im Anschluss an insgesamt 28 Tage Wachstum (insgesamt 7 Passagen im Abstand von 4 Tagen) die Auswirkungen des MB auf das Langzeit-Zellwachstum bestimmt werden.

Vorbereitung der Zellen - Bei der Behandlung der Zellen wurde bis zum Zählvorgang wie bei der Passage beschrieben, verfahren. Beim Zählen wurde bezüglich des Mediums von dem Protokoll der Passage abgewichen. Zur Aufrechterhaltung der Kulturbedingungen wurden die Zellen in ihrem jeweiligen Kulturmedium gezählt. Dazu wurde der bei der Sedimentation entstehende Überstand komplett entfernt. Anschließend wurden 300µl einer Lösung, die in den Konzentrationsverhältnissen dem jeweiligen Testmedium (Vollmedium, Vollmedium mit 100nM MB) entsprach, auf die Zellen pipettiert. Das Sediment wurde in 300µl Medium resuspendiert und die Zellen weitgehend dissoziiert. Es folgte eine Zugabe von weiteren 700µl des jeweiligen Mediums mit dem erneut resuspendiert wurde. Der verbleibende Teil des Zählvorgangs erfolgte wie bei der Passage. Es wurden stets drei Messungen pro Probe durchgeführt und die Ergebnisse anschließend gemittelt.

Einbringen in das Kulturmedium - Es wurden jeweils 200.000 Zellen in das entsprechende Testmedium überführt. Nach vorsichtigem Schwenken zur Verteilung der Zellen im Medium verbleiben die Kulturschalen bis zur erneuten Messung für vier Tage im Inkubator (37°C, 5.0%). Diese Prozedur wurde über sieben Passagen (à 4 Tage) durchgeführt, sodass die Zellen insgesamt über einen Zeitraum von 28 Tagen in ihrem Wachstumsverhalten beobachtet wurden.

2.4. Short Term Proliferation/ BrdU-Assay

Die Short Term Proliferation diente wie die Long Term Proliferation der Untersuchung des Wachstums-, bzw. Teilungsverhaltens der neuronalen Stammzellen. Bei dem BrdU-Assay wurde ein kürzerer Wachstumszeitraum (24 Stunden) betrachtet.

Grundlagen - Das dem BrdU-Assay zu Grunde liegende Prinzip besteht in der selektiven Markierung der innerhalb eines Beobachtungszeitraums synthetisierten DNA mit Hilfe des Thymidin-Analogons 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU). An eine 24-stündige Kultivierung der zu untersuchenden Zellen in ihrem jeweiligen Versuchsmedium schloss sich hierzu eine einstündige Inkubationszeit der Zellen mit BrdU an. Aufgrund der Konzentrationsverhältnisse wurde überwiegend das Thymidin-Analogon 5-Bromo-2'-desoxyuridin an Stelle des regulären DNA-Bausteins Thymidin in die innerhalb dieser Stunde neu synthetisierte DNA eingebaut. Um die

Zellen sensitiver für den Einbau von BrdU zu machen, wurde zusätzlich zu dem Überschuss an BrdU 5-Fluoro-2'-Desoxyuridin, ein Hemmer der endogenen Thymidin-Synthase, zugefügt.

Im Anschluss an die Inkubationszeit des BrdU wurde die DNA der Zellen mit Hilfe einer Nuklease verdaut. Durch die Aktivität der Nuklease wurde das zuvor in die DNA integrierte BrdU für eine anschließende Reaktion mit einem Antikörper (Anti-BrdU) besser zugänglich gemacht. Der BrdU-spezifische Antikörper (Anti-BrdU) wurde durch einen weiteren Antikörper (Cy3 Goat Anti Mouse) selektiv markiert.

Aufgrund fluoreszierender Eigenschaften konnte der Cy3-Antikörper fluoreszenzmikroskopisch detektiert und die proliferierten Zellen (mit BrdU) zuverlässig identifiziert werden. Um den Anteil der proliferierten Zellen an der Gesamtzellzahl zu bestimmen, wurden alle im Versuch verwendeten Zellen zusätzlich mit dem ebenfalls fluoreszierenden Kernfarbstoff 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) markiert. Der Quotient aus proliferierten (BrdU-markierten) Zellen und Gesamtzellzahl konnte beim Vergleich zwischen Positivkontrolle und Testsubstanz-haltigem Nährmedium den Einfluss der Testsubstanz auf die Zellproliferation zeigen.

Der Versuchsablauf sowie Teile der verwendeten Reagenzien wurden dem Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System entnommen. An einigen Stellen (siehe Hinweise) wurde von der vorgeschlagenen Prozedur abgewichen und durch die im folgenden Text erläuterten Reagenzien bzw. Arbeitsschritte ersetzt.

Beschichten der Deckgläser - Für die im Versuch erfolgende Kultivierung der Zellen wurden 48 Stunden vor dem Versuch Deckgläser für 24 Stunden in jeweils 200µl einer 1:100 Lösung aus Matrigel in DMEM eingelegt. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Matrigel-haltige Lösung vollständig entfernt und durch jeweils 500µl einer mit dem jeweiligen Testmedium versehenen Zellsuspension ersetzt.

Herstellen der Zellsuspension - Zur Herstellung der Zellsuspension wurden die Zellen wie bei der regulären Passage vorbereitet und sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen im jeweiligen Testmedium (reines Vollmedium/ Vollmedium mit 100nM MB) gezählt. Es wurde pro Testsubstanz eine Zellsuspension mit jeweils 35.000 Zellen pro 500µl Suspension hergestellt.

Kultivierung im Testmedium - Zur Kultivierung der Zellen wurden jeweils 500µl der entsprechenden Zellsuspension auf die mit Matrigel beschichteten Deckgläser pipettiert. Die Zellen wurden 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Einbringen des BrdU - Das Einbringen des BrdU erfolgte im Anschluss an die 24-stündige Inkubation der 48-Loch-Platte bei 37°C. Zum Einbringen des Proliferationsmarkers BrdU wurde das jeweilige Testmedium im Mischungsverhältnis 1:1000 mit dem BrdU- und 5-Fluoro-2'-Desoxyuridin-haltigen „Labeling Reagent“ versetzt. Die Lösungen wurden 20 Minuten im Inkubator (37°C) erwärmt. Im Anschluss wurde die zuvor 24 Stunden inkubierte 48-Loch-Platte dem Inkubator entnommen. Jeweils 400µl der 500µl Zellsuspension wurden pro Loch abgenommen und durch 250µl des jeweiligen, mit „Labeling Reagent“ versehenen Testmediums ersetzt. Die 48-

Loch-Platte wurde 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Innerhalb der 60 Minuten war es dem Thymidin-Analogon BrdU möglich, sich an Stelle des DNA-Bausteins Thymidin in die in diesem Zeitraum synthetisierte DNA einzufügen.

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Medien mit Hilfe einer an eine Vakuumpumpe angeschlossenen Einmal-Glas-Pasteur-Pipette komplett von den Deckgläsern abgetragen. Zur vollständigen Entfernung möglicher Restbestände erfolgte eine fünfminütige Waschung mit jeweils 1000µl PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) auf einem mild eingestellten Rüttler.

Fixierung der Zellen - Zur Fixierung der Zellen wurden nach vollständiger Entfernung des PBS jeweils 500µl Paraformaldehyd (4%ig) auf jedes Deckglas pipettiert und 20 Minuten auf dem Rüttler belassen. An die Fixierung schloss sich eine vierminütige Waschung mit 1000µl PBS pro Well auf dem Rüttler an. Die Waschung wurde 3 Mal durchgeführt.

Binden des Antikörpers - Zur Vorbereitung des Antikörpers (Anti-BrdU) gegen das in die DNA integrierte BrdU wurde die gefriergetrocknete Nuklease mit 4000µl A. bidest und 40µl Anti-BrdU versetzt. Im Anschluss an ein ausführliches Mischen wurden jeweils 150µl der auf Raumtemperatur erwärmten Lösung auf jedes Deckglas pipettiert. Zur Kontrolle wurde jeweils ein Deckglas pro Testkonzentration an Stelle der Antikörper-haltigen Lösung mit 150µl A. bidest versehen. Die 48-Loch-Platte wurde 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Innerhalb der 60 Minuten wurde die DNA der Zellen mit Hilfe der Nuklease verdaut. Die zeitgleich erfolgende Bindung des spezifischen Antikörpers (Anti-BrdU) an das in der DNA befindliche BrdU wurde durch die Vergrößerung der DNA Oberfläche verstärkt. Im Anschluss an die Reaktion des Antikörpers folgte 3 Mal eine jeweils vierminütige Waschung der Deckgläser mit PBS auf dem mäßig eingestellten Rüttler.

Färbung - Für die Färbung der Zellen wurde sowohl bezüglich des Versuchsablaufs als auch bezüglich der verwendeten Reagenzien von dem Protokoll des Amersham Cell Proliferation Kit abgewichen. Um ein Abschwächen der Fluoreszenz zu vermeiden, wurde bei der Vorbereitung der fluoreszierenden Reagenzien und allen sich anschließenden Arbeitsschritten zudem möglichst lichtgeschützt gearbeitet.

Für die Färbung des Anti-BrdU mit dem Cy3 markierten Antikörper wurde der Antikörper im Verhältnis 1:1000 mit eisgekühltem PBS gemischt. Jeweils 300µl der Lösung wurden auf jedes Deckglas pipettiert und im Anschluss 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30 Minuten wurde der Antikörper komplett entfernt und mögliche Überreste durch eine dreimalige Waschung mit PBS nach dem bisherigen Schema ausgewaschen.

Im Anschluss an die selektive Färbung der proliferierten Zellen durch den fluoreszierenden Antikörper (Cy3 Goat-Anti-Mouse) erfolgte eine unselektive Zellfärbung durch den fluoreszierenden Kernfarbstoff 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Für die Färbung wurde DAPI (20mg/ml in A.bidest) im Verhältnis 1:1000 in PBS gelöst. Nach ausführlichem Mischen wurden jeweils 300µl der Lösung auf jedes Deckglas pipettiert und 10 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Durch ein Binden des DAPI an die in jeder Zelle enthaltene DNA konnten alle Zellen unabhängig von ihrem Proliferationsstatus markiert werden.

Aufbringen auf die Objektträger - Im Anschluss an die Inkubation erfolgte eine dreimalige Waschung mit PBS nach dem bisherigen Schema. Nach der Waschung wurden jeweils 50µl PBS auf jedes Deckglas pipettiert. Die Deckgläser wurden mit einer Pinzette einzeln entnommen und in A. bidest getaucht. Nach kurzem Abtrocknen wurden die Deckgläser mit der Oberseite nach unten in 22µl des zuvor auf Raumtemperatur erwärmten „Anti-Fade“ (MoBiGlow) gelegt. Zum Erhalt der Fluoreszenz und Ausharzen des „Anti-Fade“ wurden die Objektträger 24 Stunden lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

2.5. Migration

Neuronale Stammzellen können zielgerichtet und aktiv die Poren (8µm) von Polycarbonatmembranen durchwandern, wobei die Anzahl der migrierten Zellen Aussagen über die Chemoattraktivität der verwendeten Substanzen zulässt. In dieser Arbeit sollte das Wanderungsverhalten der Stammzellen als Reaktion auf MB quantifiziert werden. Für eine Quantifizierung der gewonnenen Ergebnisse wurde zusätzlich das Wanderungsverhalten zum Vollmedium (EGF/FGF-2-haltig, Positivkontrolle) sowie zu DMEM (frei an Wachstumsfaktoren, Kontrolle) erfasst.

Aufbau - Als Vorrichtung zum Erfassen der zielgerichteten Wanderung diente eine Boyden Chamber (Boyden 1962) mit zwei voneinander durch eine Polycarbonatmembran separierbaren Kammern. Die untere Kammer enthielt eine zentrale halbkugelförmige Aussparung, in die das entsprechende Testmedium pipettiert wurde. Nachdem eine Polycarbonatmembran oberhalb der Vertiefung platziert wurde, wurde die obere Kammer in die untere Kammer geschraubt. Die obere Kammer enthielt eine, die gesamte Kammer durchziehende, zylinderförmige Aussparung. Die Unterseite der oberen Kammer stand dadurch ganzflächig mit der darunterliegenden Polycarbonatmembran in Kontakt. In die Vertiefung der oberen Kammer wurden die Zellen in DMEM pipettiert. Den Zellen war es im Folgenden möglich, aktiv durch die Poren der Membran zu der Testsubstanz in der unteren Kammer zu migrieren.

Vorbereitung - Die für die Migration verwendeten Zellen wurden am Tag vor dem Versuch regulär passagiert und bis zum Versuchstag in 10ml Vollmedium inkubiert. Die Polycarbonatmembranen wurden am Tag vor dem Versuch in 600µl einer Mischung aus Matrigel und DMEM (1:100) eingelegt und mindestens 6 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Die Beschichtung mit Matrigel war wichtig, um eine Adhärenz der einzelnen ANSC an der Polycarbonatmembran zu gewährleisten.

Am Versuchstag wurden die zuvor passagierten Zellen wie bei der regulären Passage vorbereitet und sedimentiert. Im Unterschied zur regulären Passage wurde der überwiegend aus Vollmedium bestehende Überstand komplett entfernt. Anschließend wurden zunächst 300µl DMEM auf das

Sediment pipettiert und mit diesem resuspendiert. Nach einer weiteren Zugabe von 700µl DMEM wurde erneut resuspendiert. Die komplette Entfernung des Vollmediums und Ersetzen des Mediums durch DMEM (frei an Wachstumsfaktoren) diente einer Anregung des Wanderungsverhaltens der Zellen. Die Wanderungsbereitschaft ist bei im Vollmedium befindlichen Zellen aufgrund der spezifischen Inhaltsstoffe deutlich geringer ausgeprägt. Diese Maßnahme minimierte die Möglichkeit des Überdeckens eines eventuellen Effekts der zu testenden Substanzen durch die im Vollmedium enthaltenen Wachstumsfaktoren.

Es wurde eine Zellsuspension von 50.000 Zellen in einer Gesamtmenge von 220µl Medium pro Boyden Chamber hergestellt. Zum Befüllen der Boyden Chamber wurden zunächst 55µl der jeweiligen Testsubstanz in die zentrale Vertiefung der unteren Kammer pipettiert. Anschließend wurden die Membranen vorsichtig den Wells der 24-Loch-Platte entnommen und blasenfrei auf der zentralen Vertiefung mit der Testsubstanz platziert. Der obere Teil der Chamber wurde fest in den unteren Teil geschraubt. Zur Befüllung der oberen Vertiefung wurden jeweils 220µl der Zellsuspension entnommen und blasenfrei in die zylinderförmige Öffnung der oberen Kammer pipettiert.

Migration - Die Boyden Chamber wurden 6 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. In dieser Zeit konnten die ANSC, durch die Testsubstanz geleitet, aktiv die 8µm großen Poren der Polycarbonatmembranen durchwandern.

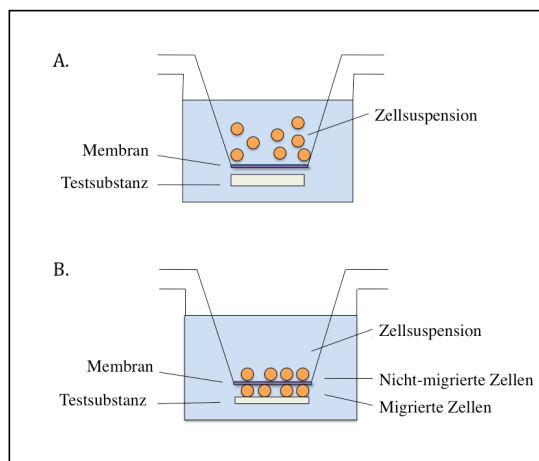


Abbildung 3: Boyden Chamber vor (A) bzw. nach (B) der zellulären Migration.

Färbung - Nach 6 Stunden wurden die Chamber aus dem Inkubator entnommen. Durch Ausschütteln bzw. Ausklopfen der Chamber wurde die in der oberen Kammer befindliche Zellsuspension entfernt. Die obere Kammer wurde abgeschraubt. Die Membran wurde unter vorsichtigem Abstreifen der Oberseite zur Entfernung der nicht migrierten Zellen aus der unteren

Kammer entnommen. Mit der Unterseite nach oben wurde sie für die Färbung in einer mit Wachs ausgegossenen Petrischale mit Stecknadeln fixiert.

Für die Fixierung der gewanderten Zellen wurden die Membranen für eine Minute mit 50ml 100%-igem Ethanol bedeckt. Im Anschluss wurde das Ethanol vorsichtig abgegossen und die Membranen leicht mit A.dest gewaschen. Zur Färbung der Zellen wurden die Membranen mit 40ml einer Lösung aus Giemsa und A.dest (1:10) bedeckt. Nach zwanzig Minuten wurde die Giemsa-Lösung vorsichtig abgegossen und die Membranen mit A. dest gewaschen.

Zur Fixierung auf dem Objektträger wurde die Membran nach kurzem Abtrocknen mit der Unterseite nach oben auf den Objektträger platziert und mit einem Tropfen DPX sowie einem Deckglas fixiert. Die Hinzugabe von DPX wirkte einem nachträglichen Ausbleichen des Farbstoffes entgegen. Die Objektträger wurden über Nacht getrocknet.

2.6. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)/ Real-Time RT PCR

2.6.1. Gewinnung der Zellen

Die bei der qPCR untersuchten Zellen wurden im Vorfeld in zwei verschiedenen Medien (100nM MB bzw. reines Vollmedium) kultiviert. An fünf getrennten Zeitpunkten wurden Zellen der Kultur isoliert und bei -80°C kryokonserviert. Die Zellsuspensionen wurden hierfür 10 Minuten bei 800rpm und 21°C zentrifugiert. Im Anschluss an die Sedimentation wurde der zellfreie Überstand entfernt. Auf das verbleibende Sediment wurden jeweils 1000µl einer „Frosting Solution“ aus Vollmedium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) pipettiert. Das Sediment wurde nach einmaliger Resuspension in der Lösung komplett mit dieser aufgenommen und in ein Cryo-Tube übertragen. Die Cryo-Tubes wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C konserviert.

2.6.2. RNA-Extraktion

Die für die RNA Extraktion verwendeten Reagenzien sowie der Ablauf der Extraktion wurden den Anleitungen des RNEasy Mini Kit entnommen. Um einer während der Extraktion möglichen Kontamination mit RNasen entgegenzuwirken, wurden ausschließlich sterile, RNase-freie Röhrchen und Pipettenspitzen verwendet. Die Extraktion wurde, soweit nicht gesondert vermerkt, bei Raumtemperatur (20-25°C) durchgeführt.

Vorbereitung der Zellen - Die bei -80°C konservierten Zellsuspensionen wurden im 37°C warmen Wasserbad zügig auf Raumtemperatur erwärmt und von den Cryo Tubes in Versuchsröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in einer Mikrozentrifuge 5 Minuten bei 2100rpm zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde entfernt.

Lyse der Zellen - Für die Lyse der enthaltenen Zellen wurde eine an die enthaltene Zellzahl angepasste Menge (350 µl bei Zellzahlen $< 5 \times 10^6$ Zellen, 600µl bei Zellzahlen $> 5 \times 10^6$ Zellen) RLT Lysis Buffer auf das Sediment pipettiert. Die Zelllyse wurde durch ein sich anschließendes starkes Mischen noch weiter unterstützt. Zur Entfernung der Zellreste und Verminderung der

Viskosität wurden max. 700µl der Lösung in eine QiaShredder Säule überführt und 2 Minuten bei 14.000rpm sedimentiert. Die Zellreste wurden von der in der QiaShredder Säule befindlichen Trennmembran gebunden, wodurch sich als Durchfluss eine weitgehend homogene Lösung ergab.

Extraktion der RNA - Die RNA-haltige Lösung wurde in ein neues Röhrchen überführt. Zu der Lösung wurde das gleiche Volumen an Ethanol hinzugefügt (je nach verwendeter Zellmenge 350µl bzw. 600µl) und in diesem durch ausführliches Mischen gleichmäßig verteilt. Zur Extraktion der RNA wurden max. 700µl der Ethanol-haltigen Lösung in eine Mini Spin Column überführt und bei 10.000rpm 15 Sekunden lang zentrifugiert.

Das Ethanol ermöglichte ein Binden der in der Lösung befindlichen Nukleinsäuren an die in der Mini Spin Column enthaltene Silicagel-Membran. Der weitgehend RNA-freie Durchfluss konnte im Anschluss an die Sedimentation verworfen werden. Falls das Gesamtvolumen der Ethanol-haltigen Lösung 700µl übertraf, wurde der zuvor erläuterte Sedimentationsschritt mit dem verbliebenen Volumen in der gleichen Mini Spin Column erneut durchgeführt.

Reinigen der RNA - Im Anschluss an die Fixierung der RNA an die Silicagel-Membran erfolgte eine Reinigung der RNA mit Wasch-Puffern (RW1, RPE). Für den ersten Waschschrift wurden jeweils 350µl Puffer RW1 in jede Mini Spin Column pipettiert und 15 Sekunden bei 10.000 rpm sedimentiert. Der Durchfluss wurde verworfen.

Zur Entfernung der an der Silicagel-Membran haftenden DNA wurden 80µl einer DNase Lösung (10µl DNase Stock Solution, 70µl Puffer RDD; RNase-free DNase Set, Qiagen) unmittelbar auf die Silicagel-Membran pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubiert. Im Anschluss an den Verdau der DNA erfolgte eine erneute Waschung mit jeweils 350µl Puffer RW1, sowie eine 15-sekündige Zentrifugation bei 10.000rpm. Der Durchfluss wurde verworfen. Der obere Teil der Mini Spin Column wurde in ein neues Collection Tube (2ml) überführt. Zur weiteren Reinigung erfolgte eine Zugabe von jeweils 500µl Puffer RPE. Die Röhrchen wurden 15 Sekunden bei 10.000rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Arbeitsschritt wurde wiederholt. Die Mini Spin Column wurde in ein neues Collection Tube (2ml) überführt. Es folgte eine zweiminütige Zentrifugation bei 10.000 rpm zum Trocknen der Mini Spin Column. Die Mini Spin Column wurde in ein neues Collection Tube (2ml) überführt und 1 Minute bei 14.000rpm zentrifugiert.

Elution der RNA - Zur Elution der RNA wurde die Mini Spin Column in ein Collection Tube (1,5ml, mit Deckel) überführt. Auf die Silicagel-Membran wurden 30µl RNase-freies Wasser pipettiert. Die Mini Spin Column wurde 3 Minuten auf Eis gelegt. Der Durchfluss, der mit der folgenden, einminütigen Zentrifugation bei 10.000 rpm gewonnen wurde, enthielt einen Großteil der zellulären RNA. Eine Wiederholung des geschilderten Elutionsschrittes diente einem Ablösen der restlichen RNA von der Silicagel-Membran. Das Collection Tube (1,5ml, mit Deckel) wurde fest verschlossen und bei -80°C kryokonserviert. Der obere Teil der Mini Spin Column wurde verworfen.

2.6.3. Reverse Transkription

Ziel der Reversen Transkription war eine Synthese von komplementären DNA-Strängen (sog. complementary DNA, kurz: cDNA), zu der zuvor extrahierten zellulären RNA. Die Umschreibung war für eine nachfolgende quantitative Analyse der zellulären Genexpressionsmuster im Rahmen der Real-Time-PCR erforderlich.

2.6.3.1. Reverse Transkription Konditionen

Die Reverse Transkription wurde in einem Mastercycler Thermocycler (Marke Eppendorf) durchgeführt. Zu Beginn wurde der Reaktionsansatz zur optimierten Bindung der Random-Hexamer Primer 10 min bei 25°C (Raumtemperatur) inkubiert. Es folgte eine 50-minütige Erwärmung auf 42°C mit einer maximalen Aktivität der Reversen Transkriptase. Eine anschließende 15-minütige Temperaturerhöhung auf 70°C und darauffolgende Abkühlung auf 4°C bewirkten eine Inaktivierung der Reversen Transkriptase und Separierung dieser von der synthetisierten cDNA.

2.6.3.2. Reverse Transkription Protokoll

Zunächst wurde die zuvor extrahierte und bei -80°C kryokonservierte Lösung aus zellulärer RNA kurz mit dem Schüttler gemischt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Im Anschluss wurde ein Master Mix aus den für die enzymatische Reaktion erforderlichen Substanzen hergestellt. Jede Reverse-Transkriptions-Reaktion (20µl) enthielt 14µl des Master Mix bestehend aus jeweils 1µl Superscript II RT (15U/µl), 4µl 5-facher cDNA Synthese Puffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 2µl 0,1M Dithiothreitol (DTT), 1µl gemischte dNTP, 1µl gemischte Primer (Random Hexamer Primers), 0,5µl RNase Inhibitor sowie 4,5µl RNase freies (DEPC-behandeltes) Wasser.

Pro Reaktion wurde 1µg der jeweiligen RNA-Lösung auf Eis vorgelegt. Zum Erreichen eines Volumens von 6µl wurde eine auf die jeweilige RNA-Konzentration angepasste Menge RNase-freien Wassers hinzugefügt. Pro Reaktionsröhrchen wurden 14µl des Master Mix addiert und die Reaktion gestartet. Im Anschluss an die Reverse Transkription wurden die Reaktionsröhrchen kurz abzentrifugiert. Um das Reaktionsprodukt von verbliebener RNA zu reinigen, folgte eine Zugabe von je 1µl RNase H pro Reaktionsröhrchen und eine 20-minütige Inkubation bei 37°C. Die cDNA-Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung kurzzeitig bei -20°C, längerfristig bei -80°C gelagert. Für die weitere Verwendung im Rahmen der Real-Time RT PCR wurde die bei der Reversen Transkription gewonnene cDNA der Proben jeweils im Verhältnis 1:25 mit A.bidest verdünnt.

2.6.4. Quantitative PCR/ Real-Time RT PCR

Die Real-Time RT PCR ermöglichte eine quantitative Analyse der in einer Probe jeweils enthaltenen cDNA zu ausgewählten Zielgenen und erlaubte somit Rückschlüsse auf zelluläre Genamplifikationsmuster der ANSC unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Die quantitative Analyse im Rahmen der Real-Time RT PCR liefert keine absoluten Messwerte. Ein

Vergleich der Messwerte der Versuchsproben mit Messwerten einer Lösung mit standardisiertem DNA-Gehalt (Standards) ermöglicht allerdings die Bildung von Verhältniswerten (sog. Standard Curve Method). Für die in dieser Arbeit verwendete quantitative Analyse mit Hilfe der Standard Curve Method war im Vorfeld der Real-Time RT PCR die Vorbereitung von sog. Standards notwendig.

Standards - Zur Herstellung der Standards wurde eine definierte Menge cDNA in A. bidest verdünnt, sodass eine Lösung mit einer cDNA-Konzentration von 10ng/μl resultierte. Diese Lösung diente im Folgenden als Grundlage für eine Verdünnungsreihe. Durch anschließende Verdünnungsschritte wurden vier weitere Lösungen mit definierten cDNA-Konzentrationen von 3ng/μl, 1ng/μl, 0.3ng/μl sowie 0.1ng/μl hergestellt. Jeweils Triplets dieser Standards wurden bei jeder durchgeführten Real-Time RT PCR-Reaktion zusätzlich zu der cDNA der Versuchsproben aufgetragen. Die definierten cDNA-Konzentrationen der Standards ermöglichten die Bildung einer „Messskala“, anhand derer die Messwerte der Versuchsproben quantifiziert werden konnten.

2.6.4.1. Real-Time RT-PCR Konditionen

Die Real-Time-RT-PCR wurde in einem Rotorgene 2000 durchgeführt. Zu Beginn wurden die Reaktionsansätze zur Aktivierung der thermostabilen Taq DNA Polymerase (*Thermus aquaticus*) 15 min auf 95°C erhitzt. Es folgten 35 Zyklen mit jeweils 30 sec Denaturierung bei 95°C, gefolgt von 30 sec bei 60°C zum Initiieren der enzymatischen Reaktion. Für den Melting Step, bei dem die neu synthetisierte Doppelstrang-DNA (dsDNA) separiert wird, wurde initial 10 sec lang eine Temperatur von 60°C gewählt. Zur Gewinnung einer Schmelzkurve wurde die Reaktionstemperatur dieses Schritts im Verlauf des Versuchs sukzessive um jeweils 0,5°C pro Zyklus verringert.

2.7.4.2. Real-Time RT-PCR Protokoll

Die bei der Reversen Transkription gewonnene und bei -20°C bzw. -80°C gelagerte cDNA der Versuchsproben bzw. der Standards wurde bei Raumtemperatur vollständig aufgetaut. Für jede Real-Time RT-PCR Reaktion (25μl) wurden 15μl des Master Mix bestehend aus jeweils 12,5μl einer mit SYBR Green versetzten Taq DNA Polymerase (*Thermus aquaticus*), 1μl des 3' allerspezifischen Primers, 1μl des 5' allerspezifischen Primers, sowie 0,5μl A. dest. vorbereitet. Das Reaktionsgemisch wurde bis zur weiteren Verwendung lichtgeschützt und auf Eis gelagert. Pro Reaktion wurden 10μl der jeweiligen Proben-, bzw. Standard-cDNA vorgelegt. Anschließend wurden zügig jeweils 15μl des Master Mix addiert und das Versuchsgerät mit den Reaktionsröhrchen befüllt. Während der Pipettierarbeiten wurden die Reaktionsröhrchen in einem gekühlten Aluminiumblock gelagert und ein frühzeitiges Einsetzen der Versuchsreaktion noch vor der Aufzeichnung durch das Messgerät somit möglichst unterbunden. Als Kontrolle dienten pro Versuchslauf 3 Reaktionsröhrchen, die A.dest. anstelle von cDNA enthielten.

Quantifizierung - Das in diesem Protokoll verwendete SYBR-Green ist ein Cyanin-Farbstoff mit DNA-bindenden Eigenschaften (sog. Interkalanz). Ein Binden an dsDNA resultiert in einem

Anstieg der farbstoffeigenen Fluoreszenz. Eine, im Rahmen der PCR erfolgende Konzentrationserhöhung der dsDNA im Reaktionsgemisch führte dementsprechend zu einer relativen Zunahme der Fluoreszenz, die in der exponentiellen Phase der Reaktion als annähernd proportional betrachtet werden konnte. Durch eine integrierte Fluoreszenzmessung ermöglichte die Real-Time RT PCR im Gegensatz zu konventionellen PCR daher neben einer DNA-Amplifikation eine quantitative Analyse der in einem Reaktionsansatz befindlichen dsDNA. Im Falle einer „zweischrittigen“ Real-Time PCR, bei der im Vorfeld zusätzlich eine reverse Transkription erfolgt, werden so Rückschlüsse auf den zellulären Gehalt spezifischer Ribonukleinsäuren bzw. Genamplifikationmuster möglich.

Auswahl der Gene – Mit Hilfe der quantitativen PCR-Methode wurden im Rahmen dieser Arbeit die Expressionsraten von neun verschiedenen Genen erfolgreich ermittelt (s. Tabelle 1). Die entsprechenden Primersequenzen wurden teilweise aus vorhandener Literatur entnommen (Peptidylprolyl Isomerase A, TATA-Box binding Protein, Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase, Acidic Ribosomal Phosphoprotein PO, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) (Pernot, Dorandeu et al. 2010). Die übrigen Primer (Beta-Site APP Cleaving Enzyme 1, Brain-Derived Neurotrophic Factor, Synaptophysin, Tryptophan-Hydroxylase 2) wurden anhand des unter Punkt 3.5.6. erläuterten Protokolls entworfen.

Gen	Primer	Sequenz	Tm
Peptidylprolyl Isomerase A	Pipa_fwd	5'- TAT CTG CAC TGC ?AA GAC TGA ATG	61°C
	Pipa_rev	3'- CTT CTT GCT GGT CTT GCC ATT CC	61°C
TATA-Box binding Protein	Tbp_fwd	5'- CCC TGA ATC TTG GCT GTA AAC TTG	60°C
	Tbp_rev	3'- GTT GTC CGT GGC TCT CTT ATT CTC	60°C
Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase	Hprt_fwd	5'- CTC ATG GAC TGA TTA TGG ACA GGA C	60°C
	Hprt_rev	3'- GCA GGT CAG CAA AGA ACT TAT AGC C	60°C
Acidic Ribosomal Phosphoprotein PO	Arbp_fwd	5'- GAA AAT CTC CAG AGG CAC CAT TG	60°C
	Arbp_rev	3'- TCC CAC CTT GTC TCC AGT CTT TAT C	60°C
Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	Gapdh_fwd	5'- CCC ACT CTT CCA CCT TCG ATG	60°C
	Gapdh_rev	3'- GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G	60°C
Beta-Site APP Cleaving Enzyme 1	Bace1_fwd	5'- TCG CTT GCC CAA GAA AGT AT	60°C
	Bace1_rev	3'- CTG CTC CCC TAG CCA AAA G	60°C
Brain-Derived Neurotrophic Factor	BDNF_fwd	5'- CCC ATG AAA GAA GTA AAC GTC C	61°C
	BDNF_rev	3'- GTC GTC AGA CCT CTC GAA CC	61°C
Synaptophysin	SYP_fwd	5'- CAA GGA GAT GCC TAT GTG CC	60°C
	SYP_rev	3'- AAC ACG AAC CAT AGG TTG CC	60°C
Tryptophan Hydroxylase 2	TPH2_fwd	5'- AAT TGA AGC ATG CTC TTT CC	60°C
	TPH2_rev	3'- TTC AAA ACT GTC CGA AAC AAA	60°C

Tabelle 1 : Komplementäre Primersequenzen zur mRNA (cDNA) ausgewählter Zielgene. Unter Tm ist die jeweils angewendete Schmelztemperatur angegeben.

2.6.5. Primerdesign

Um die Amplifikation sicher auf mRNA-Sequenzen zu limitieren, wurden zunächst Exon-Exon Übergänge in der mRNA-Sequenz des Zielgens ermittelt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>). Es wurde anschließend ein ca. 40bp langer Abschnitt der mRNA-Sequenz mit Exon-Exon-Übergang ausgewählt und mit Hilfe der Software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3>) eine Sequenz für den (5'-3') Primer ermittelt.

Die Auswahl des Primers fand unter Beachtung der folgenden Parameter statt: Product Size Range 50-150bp, Primer Size 18-22bp, Primer T_m (Schmelztemperatur) 59-61°C, Primer CG% 40-60, Max. 3' Self-Complementary 3, Max-Poly X 3.

Im Anschluss an die Erstellung des 5'-Primers fand nach dem gleichen Schema die Auswahl eines passenden 3'-Primers statt. Hierbei war neben genannten Parametern zusätzlich zu beachten, dass die Schmelztemperaturen (T_m) der beiden Primer um maximal 1°C differieren durften. Darüber hinaus sollte eine möglichst geringe Komplementarität der gewählten Primer zueinander am 3'-Ende (max. 3 komplementäre Basen) gegeben sein, um ein Hybridisieren der Primer miteinander und somit das Entstehen von Primerdimeren zu verhindern.

Mit Hilfe eines sog. „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST) wurde abschließend die Spezifität der gewählten Primer zu der Sequenz des Zielgens überprüft (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Hierbei wurde die Komplementarität der gewählten Primer zu jeglichen Gensequenzen in der Datenbank untersucht. Um einer fehlerhaften Bindung des ausgewählten Primers an eine vom Zielgen abweichende mRNA- bzw. cDNA-Sequenz möglichst entgegenzuwirken, war eine Mindestanzahl von drei Mismatches des Primers zu anderen Genen in der Datenbank Voraussetzung für die weitere Verwendung im Rahmen des PCR-Protokolls.

Ergebnisse

3.1. Long Term Proliferation

Für die Long Term Proliferation wurden drei separate Wachstumskurven über einen Zeitraum von jeweils 28 Tagen angefertigt. Die Versuchsgruppen wurden durch eine Kultivierung der Zellen in zwei unterschiedlichen Medien hergestellt: Vollmedium mit 100nM MB sowie Vollmedium ohne MB. Die im Abschnitt 2.2 erwähnte Kultivierung der ANSC in 1µM MB bewirkte eine deutliche Abnahme der Proliferationsrate, sodass diese Dosis als toxisch eingestuft und im weiteren Verlauf der Arbeit nicht verwendet wurde. Die Ergebnisse der Wachstumskurve in 1µM MB sind nicht im Resultateabschnitt dieser Arbeit aufgeführt.

Die zur Erhebung des Langzeitwachstums erforderliche Zellzählung erfolgte im Rahmen der Zellpassage, welche für jede der Wachstumskurven sieben Mal im Abstand von jeweils vier Tagen durchgeführt wurde. Im Anschluss an eine Aussaat von 200.000 Zellen pro Kulturflasche zu Beginn der jeweiligen Wachstumskurve wurden die Zellzahlen demzufolge an sieben getrennten Zeitpunkten erhoben. Die Untersuchungsgruppen wurden zu jedem Zeitpunkt durch Triplets (drei Kulturflaschen) repräsentiert. Die Messwerte der Triplets wurden für die nachfolgende statistische Auswertung zu Mittelwerten zusammengefasst.

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des „Student’s t-Test“ (zweiseitig, ungepaart). Die Analyse zeigte für alle drei Wachstumskurven Werte von $p > 0.05$ (Kurve 1: $p = 0.99$, Kurve 2: $p = 0.84$, Kurve 3: $p = 0.93$). Es konnte infolgedessen kein signifikanter Unterschied im Wachstum der Zellen in einem MB-haltigen Medium im Vergleich zu dem Kontrollmedium ohne Methylenblauanteil nachgewiesen werden.

Für die graphische Darstellung (Abbildung 4) der erhobenen Messergebnisse wurden die Rohdaten jeder Wachstumskurve mithilfe der Formel $N_2 = N_1 \times N_0 / 200.000$ verrechnet und in Punktediagrammen (Wachstumskurve 1-3, s.u.) aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die Zellzahlen dargestellt, auf der X-Achse der Beobachtungszeitraum (0-28 Tage). Die Graphen schneiden die Y-Achse bei 200.000, welches der zu Beginn jeder Wachstumskurve jeweils ausgesäten Zellmenge entspricht und zeigen anschließend einen annähernd linearen Verlauf. In Wachstumskurve 1-2 wurden nach 28 Tagen als Maximalwert Zellmengen zwischen $1E+12$ und $1E+13$ erreicht. Bei Wachstumskurve 3 wurden am Tag 28 der Wachstumskurve in beiden Versuchsgruppen Werte von ca. $1E+14$ Zellen erzielt. Die Wachstumskurven der zwei Versuchsgruppen zeigen bei allen drei Experimenten jeweils einen annähernd deckungsgleichen Verlauf. Es sind lediglich geringe Unterschiede feststellbar: Wachstumskurve 1 demonstriert geringgradig höhere Zellzahlen für die im MB-haltigen Medium kultivierten Zellpopulationen, Wachstumskurve 3 könnte hingegen ein leicht gesteigertes Wachstum in der MB-freien Kultur anzeigen. Eine Signifikanz der geschilderten

Unterschiede konnte mit Hilfe der statistischen Analyse (Student's t-Test, s.o.) ausgeschlossen werden.

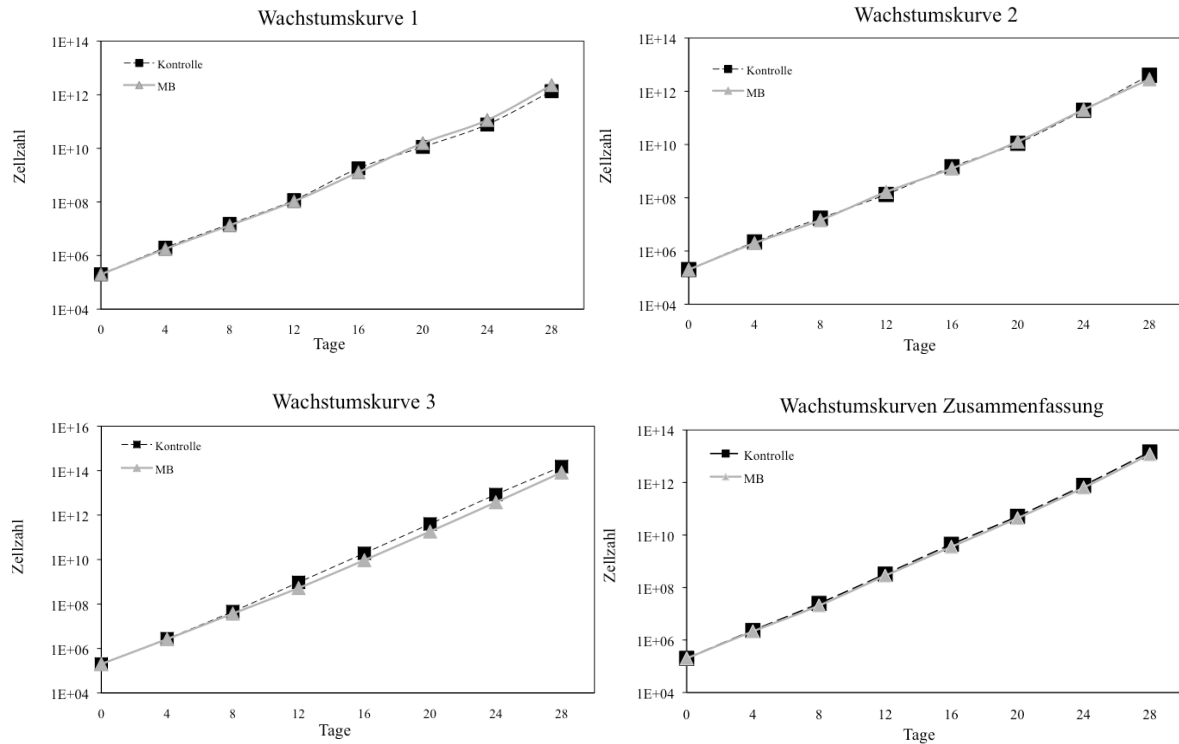


Abbildung 4:

Resultate von 3 separaten Wachstumskurven (1-3). Die Rohdaten der Einzelmessungen wurden für die graphische Darstellung mit der Formel $N_2 = N_1 \times N_0 / 200.000$ verrechnet und logarithmisiert aufgetragen. Für das Diagramm „Wachstumskurven Zusammenfassung“ wurden die Einzelergebnisse der 3 Versuchsreihen erneut gemittelt. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in den Proliferationsraten der Versuchsgruppen ($p > 0.05$).

Für die Graphik „Wachstumskurven Zusammenfassung“ (s.o.) wurden die Rohdaten der drei separaten Wachstumskurven für jeden der jeweiligen Messzeitpunkte (Tag 4, Tag 8 etc.) erneut gemittelt und die Werte anschließend mit Hilfe der Formel $N_2 = N_1 \times N_0 / 200.000$ verrechnet. Im Punktediagramm zeigen sich zwei annähernd deckungsgleiche Graden mit linearem Verlauf und maximalen Zellzahlen von ca. $1E+13$ Zellen an Tag 28 des Versuchs. Die Überschneidung der Wachstumskurven veranschaulicht das Ergebnis der statistischen Analyse mit einem nicht-signifikanten Unterschied in den Proliferationsraten der zwei Untersuchungsgruppen.

3.2. Short Term Proliferation/ BrdU- Assay

Für die Short-Term Proliferation wurden fünf unabhängige Experimente durchgeführt (n=5). Als Testsubstanzen der Versuchsgruppen dienten 100nM MB in Vollmedium sowie MB-freies Vollmedium als Kontrolle. Pro Versuchsgruppe und Experiment wurden jeweils Triplets (drei Deckgläser) angefertigt. Als Kontrolle diente jeweils ein Deckglas pro Testsubstanz.

Das Ausmaß der Inkorporation des Thymidinanalogs Bromodesoxiuridin (BrdU) in die zelluläre DNA ermöglichte im Anschluss an jedes Experiment Schlüsse auf das 24-Stunden Wachstum der ANSC. Zellen mit inkorporiertem BrdU konnten mit Hilfe eines Cy3-markierten Antikörpers fluoreszenzmikroskopisch identifiziert werden. Der Kernfarbstoff DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) ermöglichte eine unselektive Darstellung aller Zellen, die auf dem jeweiligen Deckglas enthalten waren.

Für die Auswertung wurden bei jedem Deckglas fünf zufällig ausgewählte Gesichtsfelder in einer 200-fachen Vergrößerung (20er Objektiv, 10er Okular) ausgezählt (Rohdaten s. Abschnitt 8.1.2.). Die Auszählung erfolgte stets verblindet. Für jedes Gesichtsfeld wurde der Anteil der proliferierten Zellen (mit BrdU-Inkorporation) an der Gesamtzahl der enthaltenen Zellen (Färbung mit DAPI) ermittelt. Der durchschnittliche Anteil der proliferierten Zellen an der Gesamtzellzahl betrug bei der Kultivierung in MB-haltigem Medium ca. 22.91%, beim MB-freien Medium ca. 24.42%.

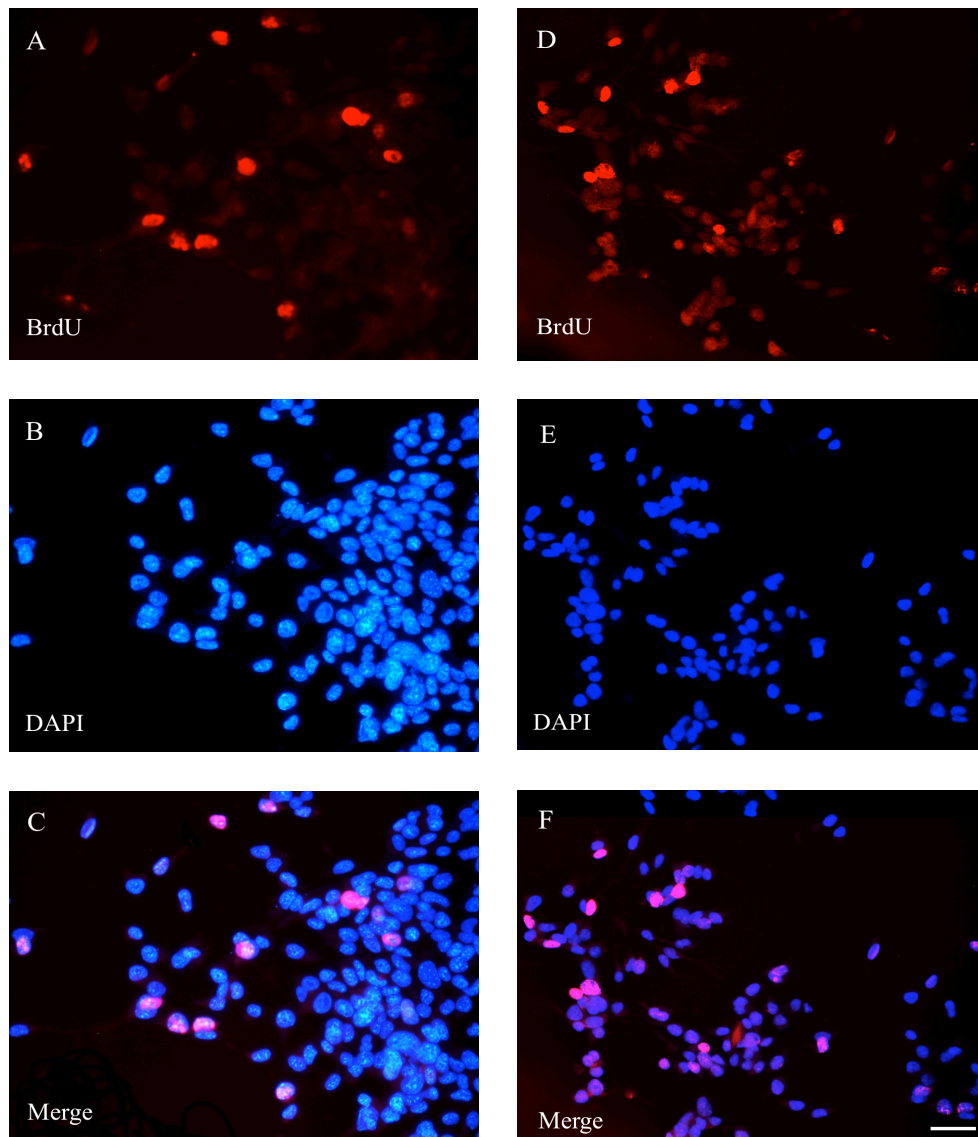


Abbildung 5:

Immunfärbung undifferenzierter ANSC in Methylenblau-haltigem Kulturmedium (A-C) und Methylenblau-freiem Vollmedium (D-F). Der Kernfarbstoff DAPI markiert proliferationsunabhängig alle vorhandenen Zellen. Der Anteil der proliferierenden Zellen wird durch die Färbung mit BrdU sichtbar. Die Abbildungen demonstrieren eine höhere Proliferationsrate im Methylenblau-freiem Vollmedium. Die Zusammenschau aller erhobenen Ergebnisse zeigt einen nicht-signifikanten Unterschied in den Proliferationsraten der 2 Versuchsgruppen ($p = 0.067$). Der Eichbalken in Bild F entspricht einer Länge von 60µm in den Bildern A-F.

Die statistische Auswertung der gewonnenen Ergebnisse erfolgte mit dem Student's t-Test (zweiseitig, ungepaart). Die Analyse ergab einen Wert von $p = 0.067$. Bei dem in dieser Arbeit gewählten Signifikanzniveau von $p < 0.05$ ergab sich somit ein nicht-signifikanter Unterschied im 24-Stunden Wachstum der Zellen in den zu vergleichenden Medien (s. Abb. 5).

Für die untenstehende Darstellung (Abbildung 6) wurden pro Experiment und Versuchsgruppe die Zählwerte von jeweils 3x5 Gesichtsfeldern (5 Gesichtsfelder bei jeweils 3 Deckgläsern pro Versuchsgruppe) verwendet. Auf Grundlage der erhobenen Messergebnisse wurde der Mittelwert der proliferierten Zellen für jedes Experiment (1-5) und Versuchsgruppe ermittelt und als Säulendiagramm aufgetragen. Die durchschnittliche Proliferationsrate (in %) zeigt sich auf der Y-Achse, die Experimente 1-5 sind auf der X-Achse dargestellt. Die Fehlerindikatoren geben die jeweilige Standardabweichung der erhobenen Zählwerte an.

Das Säulendiagramm zeigt für beide Versuchsgruppen durchschnittliche Proliferationsraten von ca. 22-27%. In den Experimenten 1-3 demonstrieren beide Gruppen eine annähernd gleiche Proliferationsstendenz. In den Experimenten 4-5 liegt die durchschnittliche Proliferationsrate der Kontrollgruppe mit Werten um 27% ca. 4-5% oberhalb des entsprechenden Werts der Versuchsgruppe mit dem MB-haltigen Kulturmedium (22-23%).

Die im Experiment 5 ermittelten Unterschiede in den Proliferationsraten der Versuchsgruppen liegen mit einem Wert für $p = 0.0184$ (Student's t-Test, zweiseitig, ungepaart) unterhalb des für diese Arbeit gewählten Signifikanzniveaus von $p < 0.05$ und sind somit statistisch signifikant. In Zusammenschau mit den Messwerten der Experimente 1-4 (nicht signifikant) kann für den gesamten Versuch aber kein signifikanter Unterschied zwischen den Proliferationsraten der beiden Versuchsgruppen nachgewiesen werden ($p = 0.067$, s.o.).

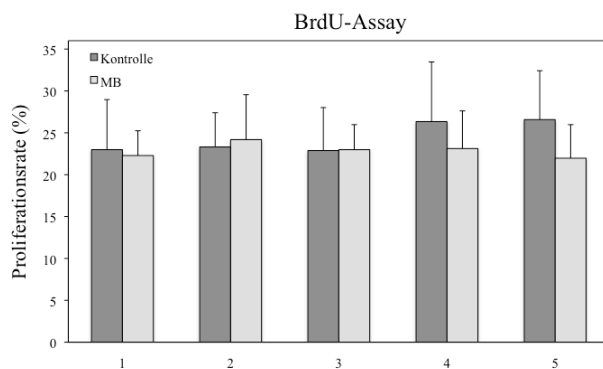


Abbildung 6: Ergebnisse des BrdU-Assay. Die Resultate der 5 Versuche sind getrennt dargestellt. Im Experiment 5 zeigt sich eine signifikant höhere Proliferationsrate der Kontrollgruppe ($p < 0.05$). Die Fehlerindikatoren repräsentieren die Standardabweichung der jeweiligen Ergebnisse.

Für das untenstehende Diagramm (Abb. 7) wurden die Mittelwerte der fünf unabhängigen Experimente für jede der beiden Versuchsgruppen getrennt zusammengefasst. Der Wert der Kontrollgruppe wurde mit 1 gleichgesetzt und der Wert des MB-haltigen Mediums damit verrechnet. Zwischen den beiden Versuchsgruppen zeigt sich ein geringgradiger Unterschied. Die im MB-haltigen Medium kultivierten Zellen demonstrieren eine im Vergleich zur Kontrolle geringere Proliferationsrate mit einem relativen Wert von 0.938, bzw. 93.8% der Teilungsrate der Kontrollgruppe. Der Unterschied der Teilungsraten ist bei dem gewählten Signifikanzniveau von $p < 0.05$ aber nicht signifikant (s.o.). Die Standardabweichungen der für die zwei Versuchsgruppen ermittelten Messungen dienten als Grundlage für die im Diagramm enthaltenen Fehlerindikatoren.

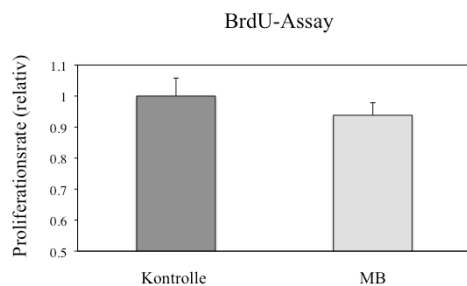


Abbildung 7: Ergebnisse des BrdU-Assay. Die Resultate der 5 Versuche wurden für jede Versuchsgruppe zusammengefasst. Die Proliferationsraten zeigen keinen signifikanten Unterschied ($p = 0.067$). Die Fehlerindikatoren entsprechen der jeweiligen Standardabweichung.

3.3. Migration

Für die Migration wurden fünf unabhängige Experimente durchgeführt ($n=5$). Als Testsubstanzen dienten 100nM MB (in DMEM), DMEM als Kontrolle sowie Vollmedium als Positivkontrolle (interner Standard). Pro Versuch wurden von jeder der drei Testsubstanzen Triplets angefertigt.

Im Anschluss an die Inkubation der Boyden Chamber mit Migration der enthaltenen ANSC wurden die Polycarbonatmembranen entnommen. Die nicht-migrierten Zellen an der Oberseite der Membran wurden mechanisch entfernt. Die migrierten Zellen an der Membranunterseite konnten nach Anfärbung mit Giemsa unter dem Mikroskop ausgezählt werden. Pro Membran wurden stets fünf zufällig ausgewählte Gesichtsfelder mit einer 400-fachen Vergrößerung (40er Objektiv, 10er Okular) verblindet ausgezählt. Insgesamt wurden für jede der drei Versuchsgruppen die Zellzahlen von 75 Gesichtsfeldern (5 Gesichtsfelder pro Membran, 3 Membranen pro Experiment, insgesamt 5 getrennte Experimente) erhoben (Rohdaten s. Abschnitt 8.1.3.).

Die statistische Analyse der erhobenen Zählwerte erfolgte mit einer einseitigen Varianzanalyse („Analysis of Variance“, ANOVA). Als Wert für α wurde 1% gewählt. Der Vergleich der Migrationsraten der drei Versuchsgruppen ergab einen Wert von $p < 0.05$ ($F(2, 222) = 273,74$). Der beobachtete Unterschied im Wanderungsverhalten konnte somit als signifikant gewertet

werden. Im Durchschnitt zeigten die ANSC zum MB-haltigen Medium (37 Zellen) eine über 7-fach stärkere Migrationstendenz als zur Kontrolle (5 Zellen). Die Positivkontrolle (Vollmedium) diente als interner Standard.

Für die graphische Darstellung (Abb. 8) wurden pro Versuchsgruppe die Ergebnisse von jeweils 75 Gesichtsfeldern verwertet. Auf der Grundlage der erhobenen Werte wurde für jede Versuchsgruppe das Minimum, Median, Maximum sowie die 25.- und 75.-Perzentile ermittelt und Box-Whisker-Plots erstellt. Auf der Y-Achse wurde die Anzahl der migrierten Zellen aufgetragen, auf der X-Achse sind die 3 verschiedenen Testkonzentrationen dargestellt.

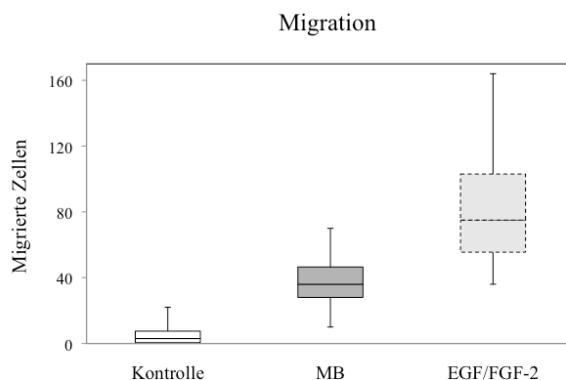


Abbildung 8: Box-Plot-Diagramm der Migrationsergebnisse. Das Diagramm stellt die Resultate von 5 getrennten Experimenten dar ($\hat{=}$ 75 Gesichtsfelder pro Versuchsgruppe). Es zeigen sich signifikante Unterschiede in den Migrationsraten der 3 Untersuchungsgruppen ($p < 0.05$). Der mit EGF/FGF-2 bezeichnete Box-Plot entspricht der Positivkontrolle (interner Standard).

Abbildung 8 veranschaulicht die ermittelten Unterschiede in den Messwerten der Versuchsgruppen. Der Medianwert beträgt bei der Kontrolle 3, beim MB-haltigen Medium 36 und bei der Positivkontrolle (interner Standard) 75 Zellen. Als Maximalwert wurden bei der Positivkontrolle (interner Standard) 164 Zellen erreicht. Im MB-haltigen Medium konnten maximal 70 migrierte ANSC gezählt werden, bei der Kontrolle 22 Zellen.

3.4. Real-Time RT PCR/ quantitative PCR

Im Vorfeld der quantitativen PCR (qPCR) wurden an 5 getrennten Zeitpunkten ANSC aus der Zellkultur isoliert. Die zu vergleichenden Versuchsgruppen wurden durch eine Kultivierung der ANSC in zwei verschiedenen Medien (100nM MB, Vollmedium ohne MB) hergestellt. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden dementsprechend 10 verschiedene Zellproben gewonnen (5 Versuchsproben mit MB-haltigem Medium, 5 Versuchsproben mit Vollmedium).

Pro Versuchslauf wurden jeweils Triplets der 5 Standardlösungen mit bekanntem Gehalt an cDNA (10ng/μl, 3ng/μl, 1ng/μl, 0,3ng/μl und 0,1ng/μl) sowie jeweils Triplets der 10 Versuchsproben analysiert. Als Kontrollen (Blinds) dienten pro Versuch 3 Wells, die A.dest. anstelle von cDNA enthielten.

3.4.1. Standard Curve Method

Entsprechend der „Standard Curve Method“ bildeten die Messwerte der definierten cDNA-Konzentrationen der Standards die Grundlage zur Bildung einer „Messskala“. Die Messskala ermöglichte eine Quantifizierung der Resultate der Versuchsproben (Kopien/ml).

Als Indikatoren für die Qualität der Messskala und demzufolge die Zuverlässigkeit der Quantifizierung der Messwerte der Versuchsproben dienten der CV-Wert (Coefficient of Variation) sowie der R^2 -Wert (Coefficient of Determination). Als Voraussetzung für die nachfolgende statistische Analyse der Messergebnisse wurde in dieser Arbeit ein CV-Wert der Standards von jeweils $\leq 20\%$ sowie ein R^2 -Wert von ≥ 0.95 gewählt. Durch die genannten Bedingungen konnten eine geringe Streuung der Messwerte der Standards (kleiner CV) sowie eine große Übereinstimmung dieser mit der Standardkurve (großer R^2) gewährleistet werden. Die Quantifizierung der Genexpressionsraten der Versuchsproben auf Basis der Messskala wurde unter der Berücksichtigung der genannten Kriterien als zuverlässig betrachtet.

Mit Hilfe der Standard Curve Method wurden im Rahmen dieser Arbeit die Expressionsraten von 4 sog. „Genes of Interest“: Tryptophan-Hydroxylase 2 (TPH-2), Beta-Site APP Cleaving Enzyme 1 (BACE-1), Synaptophysin (SYP), Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) erhoben.

Sechs weitere Gene (Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase, Acidic Ribosomal Phosphoprotein PO, TATA-Box Binding Protein, Peptidylprolyl Isomerase A, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase sowie Beta-Actin) wurden bezüglich der Stabilität ihrer Expressionsraten und somit in ihrer Eignung als Housekeeping-Gene geprüft.

3.4.2. Housekeeping-Gene

Als Housekeeping-Gene werden konstitutionell exprimierte zelluläre Gene bezeichnet. Housekeeping-Gene kodieren in der Regel für Enzyme, die essentielle Aufgaben im Rahmen der zellulären Basisfunktion ausüben. Die Expression dieser Gene hält sich charakteristischerweise in allen Zellen des Organismus unter normalen sowie pathophysiologischen Konditionen auf einem konstanten Niveau. Im Rahmen der qPCR werden Housekeeping-Gene aufgrund ihrer stabilen Expressionsraten zur Normalisierung der Expressionswerte der „Genes of Interest“ verwendet. Ziel der Normalisierung ist, Schwankungen im Expressionsverhalten der Genes of Interest möglichst auf die im Experiment hergestellte, zu untersuchende Bedingung zu limitieren.

Als Housekeeping-Gene wurden für diese Arbeit zunächst Beta-Actin (β -Actin) sowie Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GapDH) geprüft (Primersequenzen s. Tabelle 1.). Die Expression der genannten Gene erwies sich in unseren Versuchen als unzureichend stabil. Eine weitere Verwendung im Rahmen der Normalisierung der Genes of Interest wurde abgelehnt.

Auf Basis der Publikation von Pernot et al. (Pernot, Dorandeu et al. 2010) wurden die Gene Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase (Hprt), Acidic Ribosomal Phosphoprotein PO (Arbp), TATA-Box Binding Protein (Tbp) sowie Peptidylprolyl Isomerase A (Pipa) als mögliche Housekeeping-Gene geprüft. Hprt, Arbp sowie Tbp zeigten eine ausreichende Stabilität ihrer Expressionsraten und wurden für die nachfolgende Normalisierung als geeignet erachtet.

Die Prüfung der Stabilität der Housekeeping-Gene sowie die Normalisierung der erhobenen Expressionsraten der Genes of Interest erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe der Software „qBase+“.

3.4.3. Genes of Interest

Als Genes of Interest wurden in dieser Arbeit die Tryptophan-Hydroxylase 2 (TPH-2), Beta-Site APP Cleaving Enzyme 1 (BACE-1), Synaptophysin (SYP) sowie Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) gewählt. Mit Hilfe der qPCR Technik wurde die zelluläre Expressionsrate (mRNA bzw. cDNA) der genannten Gene quantifiziert. Die statistische Analyse diente der Ermittlung eines potentiell signifikanten Unterschieds zwischen den Expressionsraten der 2 Versuchsgruppen.

Die statische Auswertung sowie die graphische Darstellung der Versuchsergebnisse erfolgten separat für jedes der untersuchten Gene (s. Abschnitt 4.4.3.1.- 4.4.3.4.).

Für die statistische Analyse (Student's t-Test, zweiseitig, ungepaart) wurden die normalisierten Messergebnisse der 5 Untersuchungszeitpunkte zusammengefasst und nach Versuchsgruppen getrennt gegenübergestellt. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von $p \leq 0.05$ gewählt.

Für die graphische Darstellung (Abbildungen 9-12) wurden die 3 Messwerte, die pro Versuchsgruppe für jeden Isolationszeitpunkt erhoben wurden (Werte der Triplets), erneut gemittelt. Die normalisierten Mittelwerte wurden für jeden Zeitpunkt der Isolation in einem Säulendiagramm aufgetragen. Auf der X-Achse ist die relative Expressionsrate dargestellt. Die Angaben auf der Y-Achse (1-5) repräsentieren die 5 Isolationszeitpunkte. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung der pro Zeitpunkt und Versuchsgruppe analysierten Triplets.

3.4.3.1. Beta-site APP Cleaving Enzyme 1 (BACE-1)

BACE-1 stellt ein zentrales Enzym im Stoffwechsel des APP (Amyloid Precursor Protein) dar. Durch die enzymatische Prozessierung des transmembranären APP trägt BACE-1 u.a. zur Entstehung von Formen des Amyloid beta ($A\beta_{40}$ bzw. $A\beta_{42}$), bei. Die genannten Peptide beteiligen sich der „Amyloid-Hypothese“ zufolge maßgeblich an der Pathogenese der Alzheimer Demenz.

Durch die Untersuchung des zellulären Expressionsverhaltens der BACE-1 in dieser Arbeit sollten mögliche Einflüsse von MB auf ein wesentliches Charakteristikum der AD, der Akkumulation von Amyloid beta, erfasst und quantifiziert werden.

Die statistische Auswertung der zellulären Expressionsraten von BACE-1 ergab einen Wert $p = 0.060$. Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ konnte infolgedessen kein signifikanter Unterschied im Expressionsverhalten der beiden Versuchsgruppen nachgewiesen werden. Der Wert von $p = 0.060$ nähert sich dem gewählten Signifikanzniveau jedoch sehr an.

Abbildung 9 zeigt die relative Expression von BACE-1 für jeden der 5 Isolationszeitpunkte. Die relative Expression der Kontrollgruppe weist zwischen den 5 Zeitpunkten geringe Schwankungen auf und beträgt 0.6 - 1.1. Die Expressionsrate der ANSC im MB-haltigen Medium nimmt durchschnittliche Werte zwischen 0.9 und 1.7 ein. An 4 (1, 3-5) der insgesamt 5 Zeitpunkte ist die zelluläre Expressionsrate der Untersuchungsgruppe im MB-haltigen Medium im Vergleich zur Kontrollgruppe stärker ausgeprägt. Der Unterschied im Expressionsverhalten der Untersuchungsgruppen erreicht am Zeitpunkt 4 sein Maximum. Die Expression der ANSC in der Kontrollgruppe beträgt hier mit einer relativen Expression von 0.87 annähernd 50% der Expressionsrate der Zellen im MB-haltigen Medium (1.74).

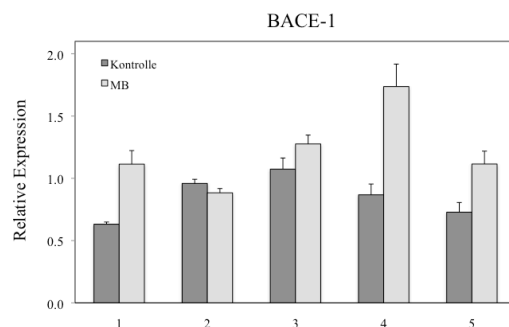


Abbildung 9: qPCR-Ergebnisse für BACE-1. Die 5 Isolationszeitpunkte sind getrennt dargestellt. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messergebnisse.

3.4.3.2. Synaptophysin (SYP)

Synaptophysin (SYP) ist ein Glykoprotein des synaptischen Vesikels. Unter anderem durch die Beteiligung an Prozessen der Exozytose sowie der kontrollierten Vesikelfusion leistet Synaptophysin einen essentiellen Beitrag zu der synaptischen Transmission (Rubenstein, Greengard et al. 1993). Synaptophysin wird ubiquitär in den präsynaptischen Endigungen der Neuronen des zentralen Nervensystems exprimiert. Immunohistochemische Markierungen

Synaptophysins ermöglichen die Quantifizierung neuronaler Synapsen (Calhoun, Jucker et al. 1996).

Der Verlust zentralnervöser Synapsen stellt ein aussagekräftiges neuropathologisches Korrelat der Alzheimer Demenz dar und ist bereits in frühen Erkrankungsstadien nachweisbar (Arendt 2009). Untersuchungen mit Hilfe von Elektronenmikroskopie und Immunohistochemie weisen darauf hin, dass ein Verlust von Synapsen ggf. besser mit dem Schweregrad der kognitiven Dysfunktion korreliert als anderweitige Hirnläsionen wie z.B. Akkumulationen von Tau-, oder Amyloid beta (Lassmann, Fischer et al. 1993).

Als undifferenzierte Zellen verfügen die in dieser Arbeit verwendeten ANSC über keine synaptische Aktivität. Die Fähigkeit, synaptische Kontakte zu bilden und zu erhalten, stellt jedoch eine wichtige Voraussetzung für eine funktionelle Integration ANSC-generierter Zellen in bestehende neuronale Netzwerke, dar. Studienergebnisse von u.a. Liebau et al. (Liebau, Vaida et al. 2007) zeigen an, dass Synaptophysin bereits in frühen Stadien der Entwicklung von ANSC nachgewiesen werden kann.

In dieser Arbeit wurden ANSC hinsichtlich des Expressionsverhaltens von Synaptophysin untersucht. Es wurde der Frage nachgegangen, ob die Kultivierung in einem MB-haltigen Medium die zelluläre Expression von Synaptophysin beeinflussen kann. Über einen derartigen Mechanismus könnte ggf. eine Veränderung der potentiellen Fähigkeit zur Synapsenbildung durch Abkömmlinge der ANSC bewirkt werden. Eine Fragestellung, die insbesondere vor dem Hintergrund des krankheitsbedingten Synapsenverlusts bei der Alzheimer Demenz und Überlegungen zur therapeutischen Stammzelltherapie relevant erscheint.

Die statistische Auswertung der zellulären Expressionsraten von Synaptophysin ergab einen Wert $p = 0.38$. Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ konnte infolgedessen kein signifikanter Unterschied im Expressionsverhalten der beiden Versuchsgruppen nachgewiesen werden.

Abbildung 10 zeigt die zellulären Expressionsraten für jeden der 5 Isolationszeitpunkte. Die relative Expression der Versuchsgruppe in MB-haltigem Medium weist bei Werten von 1.0 – 1.4 geringe Schwankungen zwischen den 5 Zeitpunkten auf. Die Expressionsrate der ANSC im Vollmedium demonstriert einen weniger stabilen Verlauf mit durchschnittlichen Werten zwischen 0.4 und 1.4. An 3 (1,4-5) der insgesamt 5 Untersuchungszeitpunkte zeigen die ANSC im MB-haltigen Medium eine stärkere Expression als die Kontrollgruppe.

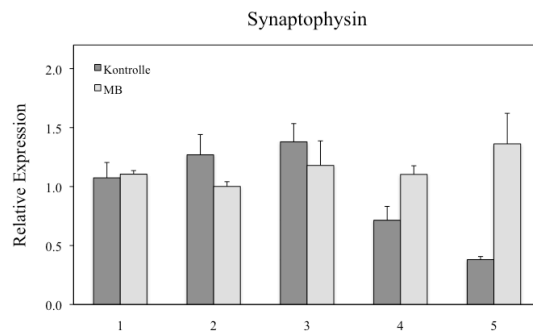


Abbildung 10: qPCR-Ergebnisse für Synaptophysin. Die 5 Isolationszeitpunkte sind getrennt dargestellt. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messergebnisse.

3.4.3.3. Tryptophan Hydroxylase 2 (TPH-2)

Das Enzym Tryptophan-Hydroxylase trägt maßgeblich zur Synthese des Neurotransmitters Serotonin bei. In Säugetieren existieren zwei unterschiedliche Isoformen der TPH (TPH-1, -2) (Walther, Peter et al. 2003). Die TPH-1 wird überwiegend in sog. “peripheren” Geweben außerhalb des zentralen Nervensystems exprimiert. Die TPH-2 findet sich ausschließlich in neuronalem Gewebe und stellt die vorherrschende Isoform im zentralen Nervensystem dar.

Eine Vielzahl morphologischer Beobachtungen und wissenschaftlicher Forschungsergebnisse weist auf eine essentielle Rolle des serotonergen Systems in der Regulierung sowohl der embryonalen als auch adulten Neurogenese, hin (Benninghoff, Schmitt et al. 2002). Der Gyrus Dentatus des Hippokampus ist einer der wichtigsten Zonen für die adulte Neurogenese und Zielort einer Vielzahl von serotonergen Nervenendigungen (Hensler, Ferry et al. 1994). Untersuchungen u.a. durch Brenzun und Daszuta konnten zeigen, dass sowohl die Hemmung der Serotonin-Synthese als auch die selektive Schädigung serotonerger Neuronen eine verminderte Aktivität in den zwei vorherrschenden neurogenen Zonen im adulten Gehirn (SVZ und SGZ) bewirken können (Brezun and Daszuta 1999). Eine medikamentöse Steigerung der serotonergen Aktivität im zentralen Nervensystem (z.B. durch Fenfluramin) scheint hingegen in einer Erhöhung der Neurogeneserate zu resultieren (Mendlin, Martin et al. 1998).

Durch die Untersuchung der zellulären Expression von TPH-2 sollte in dieser Arbeit stellvertretend eine Beeinflussung des serotonergen Systems durch MB erfasst und quantifiziert werden.

Die statistische Auswertung der zellulären Expressionsraten von TPH-2 ergab einen Wert von $p = 0.48$. Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ konnte infolgedessen kein signifikanter Unterschied im Expressionsverhalten der beiden Versuchsgruppen nachgewiesen werden.

In Abbildung 11 ist die relative Expression der TPH-2 für jeden der 5 Isolationszeitpunkte dargestellt. An 4 (1-2, 4-5) der insgesamt 5 Zeitpunkte ist die zelluläre Expressionsrate der Untersuchungsgruppe im MB-haltigen Medium im Vergleich zur Kontrollgruppe stärker ausgeprägt.

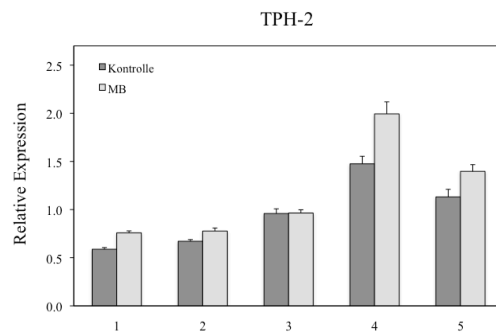


Abbildung 11: qPCR-Ergebnisse für TPH-2. Die 5 Isolationszeitpunkte sind getrennt dargestellt. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messergebnisse.

3.4.3.4. Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

BDNF gehört zu der Familie der Neurotrophine (Phillips, Hains et al. 1991, Benraiss, Chmielnicki et al. 2001, Pencea, Bingaman et al. 2001). Neurotrophine sind niedrigmolekulare Proteine, die essentielle Funktionen im Rahmen der Stimulation und Kontrolle neurogenetischer Prozesse ausüben. Als Neurotrophin bewirkt BDNF eine Steigerung der Proliferation sowie Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen des zentralen Nervensystems (Huang and Reichardt 2001). Studienergebnisse weisen darüber hinaus auf eine essentielle Rolle BDNF's für das Langzeitgedächtnis hin (Bekinschtein, Cammarota et al. 2008). In Hirnarealen, die maßgeblich an der Verarbeitung von Lern-, und Gedächtnisprozessen beteiligt sind (z.B. Hippokampus, Kortex, basales Vorderhirn), finden sich dementsprechend die höchsten Aktivitäten an BDNF (Yamada and Nabeshima 2003).

Post-mortem Analysen u.a. durch Phillips et al. (Phillips, Hains et al. 1991) konnten signifikant reduzierte Konzentrationen BDNF's im Hirngewebe von Alzheimer Patienten aufzeigen. Studienergebnisse dieser Art weisen auf eine entscheidende Beteiligung dysregulierter neurotropher Signalwege auf die Vulnerabilität neuronaler Zellen im Rahmen der Pathogenese der AD hin. Physiologische Konzentrationen neurotropher Faktoren üben hingegen schützende Effekte auf Neuronen z.B. gegen toxische Wirkungen durch A β aus (Mark, Keller et al. 1997). Nichtmedikamentöse Therapieformen der AD wie z.B. körperliches Training und kognitive Stimulation scheinen weiterhin in einer gesteigerten Produktion von BDNF zu resultieren und u.a.

über diesen Mechanismus die Gedächtnisleistung sowie die Neurogenese steigern zu können (Mattson, Maudsley et al. 2004).

In dieser Arbeit wurden ANSC hinsichtlich des Expressionsverhaltens von BDNF untersucht. Es wurde der Frage nachgegangen, ob die Kultivierung in einem MB-haltigen Medium die zelluläre Expression von BDNF beeinflussen kann. Über eine derartige Wirkungsweise könnte eine medikamentöse Therapie mit MB evtl. den reduzierten Konzentrationen neurotropher Faktoren in Patienten mit AD entgegenwirken und eine gesteigerte Neurogenese herbeiführen.

Die statistische Auswertung der zellulären Expressionsraten von BDNF ergab einen Wert $p = 0.92$. Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ konnte infolgedessen kein signifikanter Unterschied im Expressionsverhalten der beiden Versuchsgruppen nachgewiesen werden.

Abbildung 12 zeigt die zellulären Expressionsraten für jeden der 5 Isolationszeitpunkte. Die 2 Versuchsgruppen zeigen einen vergleichbaren Verlauf ihres Expressionsverhaltens mit einer deutlichen Negativtendenz zwischen den Zeitpunkten 1-5. Am Zeitpunkt 1 nimmt die durchschnittliche Expression der Versuchsgruppen Werte zwischen 2.4 (Vollmedium) und 2.8 (MB+ Medium) ein. Im weiteren Verlauf nimmt die Expressionsrate kontinuierlich ab und beträgt am Zeitpunkt 5 bei beiden Untersuchungsgruppen 0.27.

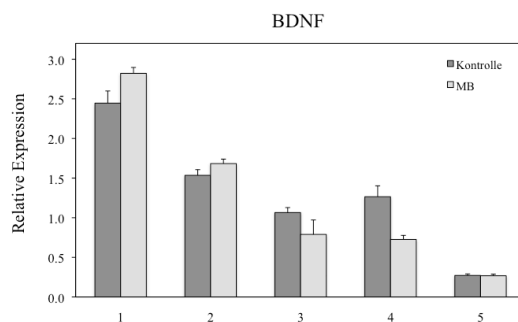


Abbildung 12: qPCR-Ergebnisse für BDNF. Die 5 Isolationszeitpunkte sind getrennt dargestellt. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messergebnisse.

Diskussion

Ziel dieser Arbeit war einen potentiellen Effekt von Methylenblau auf die zelluläre Funktion muriner ANSC zu ermitteln und ggf. zu quantifizieren. Hierfür wurden charakteristische Fähigkeiten adulter neuronaler Stammzellen wie Proliferation (24-Stunden- sowie Langzeitwachstum) und Migration untersucht. Des Weiteren wurden die Expressionsraten zweier „Neurogenese-assoziierten“ Gene: BDNF (Zigova, Pencea et al. 1998, Benraiss, Chmielnicki et al. 2001, Pencea, Bingaman et al. 2001) und TPH-2 (Benninghoff, Gritti et al. 2010) erhoben. Die Bestimmungen der relativen Expression von BACE-1 und Synaptophysin erlaubten darüber hinaus stellvertretend Aussagen über zwei der derzeit meistdiskutierten Pathomechanismen der AD: der Produktion von Amyloid β (LaFerla und Oddo 2005) sowie einer Einschränkung der synaptischen Plastizität (Arendt 2009) (weitere Informationen zur Auswahl der Genes of Interest s. Abschnitt 3.4.3.1. - 3.4.3.4. im Ergebnisteil).

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede in den Proliferationsraten (Kurz-, sowie Langzeitwachstum) der Versuchsgruppen aufzeigen. Die Ergebnisse der 24-Stunden Proliferation deuteten bei einem Wert von $p = 0.067$ zunächst auf einen annähernd signifikanten Wachstumsnachteil der ANSC in 100nM MB hin (Signifikanzniveau: $p < 0.05$). Die Resultate der Long-Term-Proliferation zeigten mit Werten von $p > 0.84$ in allen der drei Wachstumskurven jedoch vergleichbare Proliferationsraten der Versuchsgruppen. Es wurde dementsprechend nicht von einer (langfristig) relevanten Wachstumsdifferenz der ANSC durch den Einfluss von MB ausgegangen. Im Einklang mit den nicht-signifikanten Ergebnissen der Proliferationsassays fanden sich des Weiteren keine signifikanten Unterschiede in den Expressionsraten der „Neurogenese-assoziierten“ Gene BDNF ($p = 0.92$) und TPH-2 ($p = 0.48$).

Für die Erklärung der zu beobachtenden Negativtendenz in den Expressionsraten des Gens BDNF könnte die jeweilige Gesamtzellzahl der isolierten Zellen an den Versuchszeitpunkten 1-5 herangezogen werden. Beide Versuchsgruppen wurden an den Zeitpunkten 3-5 durch höhere Gesamtzellzahlen der Kultur repräsentiert als an den Zeitpunkten 1-2. BDNF als neurotropher Wachstumsfaktor fördert u.a. die Zellteilung adulter neuronaler Stammzellen (Huang and Reichardt 2001). Es wäre infolgedessen beispielsweise denkbar, dass niedrige Zellzahlen in der Kultur eine stärkere BDNF-Ausschüttung bewirken. Hohe Zellzahlen könnten hingegen über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die übermäßige Ausschüttung BDNF's unterbinden. Aufgrund des vergleichbaren Expressionsverhaltens beider Versuchsgruppen wird die geschilderte Negativtendenz in dieser Arbeit nicht zur Erklärung potentieller Effekte einer Therapie mit MB herangezogen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen insofern nahe, dass Methylenblau in einer Konzentration von 100nM keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen ausübt. Ein generelles Potential von MB zur Beeinflussung des Verhaltensmusters adulter neuronaler Stammzellen wird jedoch durch die Resultate des Migration-Assay angezeigt. Diesen Ergebnissen zufolge zeigen ANSC eine im Vergleich zur Kontrolle bis zu 7-fach gesteigerte Wanderungsbereitschaft zu MB. Die Migrationstendenz entspricht hierbei bis zu 47.5% der Werte, die bei der Wachstumsfaktor-haltigen Positivkontrolle (interner Standard) erzielt werden. MB übt, diesen Resultaten zufolge, einen signifikanten Effekt auf neuroplastische Potentiale der ANSC aus. Ein möglicher neurotoxischer Effekt der verwendeten Konzentration an MB (100nM), der anhand der Ergebnisse des BrdU-Assays diskutiert werden könnte, erscheint in Anbetracht der signifikant gesteigerten Wanderungstendenz der ANSC wenig wahrscheinlich.

Zusätzlich zu den Unterschieden in der Migrationsrate fand sich ein bei $p = 0.060$ deutlicher, wenn auch nur annähernd signifikanter Einfluss von MB auf die zelluläre Expressionsrate der BACE-1. Das Enzym BACE-1 ist ein essentiell für die Produktion aller bekannten Formen von A β (Vassar, Kovacs et al. 2009) sowie der „amyloid intracellular domain“ (AICD) (für Details zum Amyloidstoffwechsel s. Abb. 1, Seite 18). Der quantitativen Analyse zufolge bewirkt MB (100nM) in ANSC eine im Vergleich zum Vollmedium gesteigerte Expression der BACE-1. MB könnte dementsprechend einen regulatorischen Effekt auf den Amyloidstoffwechsel ausüben, einen nach dem heutigen Verständnis wesentlichen Pathomechanismus der AD. Ein beeinflussendes Verhalten auf die synaptische Plastizität - ein im Rahmen der AD-Pathogenese ebenfalls vieldiskutierter Mechanismus - durch MB konnte durch die Untersuchungen dieser Arbeit nicht angezeigt werden. Die Expressionsraten des für die Fähigkeit zur Synapsenbildung stellvertretend gewählten Proteins Synaptophysin zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen ($p = 0.38$).

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Methylenblau und Prozesse der Neuroplastizität

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen signifikanten Einfluss MBs auf die Migration als essentiellen Aspekt der Neuroplastizität. Der Begriff der Neuroplastizität fasst synaptische sowie nicht-synaptische Prozesse zusammen, die eine dynamische Modifizierbarkeit neuronaler Strukturen und Signalwege in Anpassung an interne und externe Stimuli ermöglichen (Pascual-Leone, Freitas et al. 2011). Hierzu gehören unter anderem die Möglichkeit zur adulten Neurogenese, Migration sowie die Umgestaltung bestehender synaptischer Verbindungen.

Die Erkenntnis über die Möglichkeit zur plastischen Veränderung des adulten Gehirns hat das historische Verständnis über das zentrale Nervensystem grundlegend verändert. Insbesondere die

Beobachtung der postnatalen Neurogenese und gerichteten Migration hat Raum für Überlegungen zur therapeutischen Nutzung dieses Phänomens bei hirnorganischen Erkrankungen geschaffen. So könnten diese Mechanismen in Zukunft für die Therapie lokalisierter Nervenzellverluste durch gezielte Steuerung neuer Neurone in krankheitsspezifisch geschädigte Hirnareale wie z.B. den Hippokampus in der Alzheimer Demenz verwendet werden. Eine Option, die v.a. hinsichtlich der steigenden Prävalenz neurodegenerativer Erkrankungen in der westlichen Welt bei immer noch eingeschränkten therapeutischen Optionen relevant erscheint.

4.2.1.1. Migration als Mechanismus der neuronalen Plastizität

1913 veröffentlichte Ramon y Cajal seinen Artikel „Degeneration and Regeneration of the Central Nervous System“ (Ramon y Cajal 1913). Die hierin postulierte Theorie besagte, dass die Ausbildung und Differenzierung des zentralen Nervensystems mit der Embryonalphase beendet wäre. Der Verlauf des weiteren Lebens sei durch eine zunehmende Degeneration mit Verlust von Anzahl und Vernetzung neuronaler Strukturen des ZNS geprägt. Eine Möglichkeit zur Regeneration und Wachstum in postnatalen Stadien bestünde nicht.

Innerhalb der vergangenen Jahrzehnte konnte die geschilderte Theorie in weiten Teilen widerlegt werden. Obwohl sich lediglich wenige zerebrale Strukturen im Anschluss an frühe postnatale Stadien verändern, ist heutzutage allgemein wissenschaftlich anerkannt, dass isolierte Areale (sogenannte „neurogene Nischen“) des adulten Gehirns von Säugern zu Entwicklungsprozessen wie der Neurogenese befähigt sind. Die im Rahmen dieses Prozesses entstehenden Neuronen haben weiterhin die Fähigkeit über unterschiedlich lange Distanzen zu Ziellokalisationen zu wandern (migrieren) und sich dort in neuronale Schaltkreise zu integrieren.

Die überwiegende Mehrzahl der Migrationsprozesse im zentralen Nervensystem kann in der Embryonalphase beobachtet werden (Ghashghaei, Lai et al. 2007). Mittlerweile konnten jedoch vier umschriebene Areale im Gehirn von Nagetieren identifiziert werden, in denen auch postnatal neuronale Migrationsbewegungen nachweisbar sind: das Zerebellum, der Hypothalamus, der Hippokampus sowie der rostrale migratorische Strom (RMS) (Ghashghaei, Lai et al. 2007).

Die Migrationsprozesse innerhalb des Zerebellums und des Hypothalamus sind maßgeblich in sehr frühen postnatalen Stadien nachweisbar (Ghashghaei, Lai et al. 2007). Die Einwanderung und korrekte Positionierung der neuronalen Zellen sind hierbei unter anderem essentiell für die Ausreifung und frühe Organisation der genannten Hirnareale. Im Gegensatz dazu lassen sich im Hippokampus sowie im RMS des Bulbus olfactorius von Nagetieren bis ins Erwachsenenalter eine ausgeprägte Neurogenese sowie Migrationsbewegungen nachweisen (Ghashghaei, Lai et al. 2007).

4.2.1.2. Pathophysiologische Relevanz postnataler Migrationsprozesse

Die Tatsache, dass Migrationsbewegungen in umschriebenen Arealen auch postnatal stattfinden, wirft die Frage nach der funktionellen Signifikanz dieser Prozesse im adulten Gehirn auf. Die Persistenz von neuronalen Entwicklungsprozessen liegt Hypothesen zufolge in der funktionellen Plastizität dieser Systeme begründet (Ghashghaei, Lai et al. 2007). Demzufolge könnten Migrationsprozesse im adulten Gehirn einen Mechanismus darstellen, über den Neuronen zu Lokalisationen gelangen, in denen sie für die Aufrechterhaltung und Modulierung der funktionellen neurologischen Schaltkreise erforderlich sind (Ghashghaei, Lai et al. 2007).

In der Subgranularzone (SGZ) des Hippokampus werden kontinuierlich Körnerzellen generiert, welche über kurze Distanzen in den Gyrus dentatus wandern, in den sie in Folge integriert werden (Eichenbaum 2004). Die Körnerzellen des Gyrus dentatus empfangen unmittelbare Signale aus dem entorhinalen Kortex und bilden das Moosfasersystem, das als essentielle Struktur für die Gedächtnisformation gilt (Ghashghaei, Lai et al. 2007). Die stärkste Rate an Neurogenese und nachfolgender Migration im adulten Gehirn des Nagetiers weist jedoch die Subventrikularzone (SVZ) bzw. der dazugehörige rostrale migratorische Strom (RMS) auf (Lois and Alvarez-Buylla 1993). Neuroblasten, die in der SVZ generiert werden, wandern im RMS nach rostral in Richtung des Bulbus olfactorius (Ghashghaei, Lai et al. 2007). Auf diese Weise gelangen kontinuierlich neue Interneuronen in den Bulbus olfactorius - eine Region, die aufgrund des kontinuierlichen Untergangs sensorischer Zellen des Riechepithels einen ständigen Bedarf an neuen Zellen bzw. deren funktioneller Intergration hat (Ghashghaei, Lai et al. 2007).

Es existieren Hinweise darauf, dass sich die Populationen der neu generierten Neuronen und der Prozess der gerichteten Migration im Rahmen des Alterungsprozesses verändern (Pencea, Bingaman et al. 2001, Luo, Daniels et al. 2006). So nimmt beispielsweise die Anzahl der generierten Neuronen mit steigendem Alter kontinuierlich ab (Ghashghaei, Lai et al. 2007).

Im Bulbus olfactorius unterscheiden sich die Körnerzellen, die den frühen postnatalen Stadien entstammen, sowohl funktionell als auch morphologisch von denen, die in späteren Stadien generiert wurden (Lemasson, Saghatelian et al. 2005). Während fast alle der in den frühen postnatalen Phasen entstandenen Neuronen überleben, sterben annähernd 50% der Neurone, die später im Erwachsenenalter entstehen (Lemasson, Saghatelian et al. 2005). Auch sind Unterschiede in den elektrophysiologischen Fähigkeiten dieser Zellen feststellbar (Ghashghaei, Lai et al. 2007).

Die Bedeutung dieser funktionellen und morphologischen Unterschiede im Verlauf des Altersprozesses ist bisher noch nicht geklärt. Dennoch scheinen sie parallel zu der allgemeinen Reduktion der Signalwege, die die Neurogenese und Migration regulieren, zu verlaufen (Murasu and Horwitz 2002). Dieses Erkenntnis bedingt unter anderem, dass Defizite in der adulten

Neurogenese/ Neuroplastizität zunehmend im Rahmen der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen diskutiert werden.

Bereits in den vergangenen Jahren konnte eine pathophysiologische Verbindung zwischen affektiven Verhaltensstörungen und Molekülen, die für die neuronale Migration und Positionierung relevant sind (u.a. Reelin, NRG1, ErbB4, DISC1), hergestellt werden (Ghashghaei, Lai et al. 2007). Theorien zufolge könnte eine Unfähigkeit neuronaler Vorläuferzellen in Abwesenheit der adäquaten molekularen Impulse im adulten Gehirn zur Ziellokalisation zu migrieren eine unzureichende Aufrechterhaltung der neuronalen Schaltkreise bewirken und somit zur Krankheitsgenese beitragen (Ghashghaei, Lai et al. 2007).

Ein Verständnis über die Mechanismen, durch die eine postnatale Migration neu entstandener Neuronen initiiert, unterhalten und limitiert wird, ist für das Verständnis von physiologischen Regelkreisen essentiell und könnte überdies Einblicke ermöglichen, in wiefern Veränderungen dieses Prozesses an der Entstehung hirnorganischer Erkrankungen beteiligt sind (Ghashghaei, Lai et al. 2007). Forscher erhoffen sich darüber hinaus, mit Kenntnis der molekularen Mechanismen in der Zukunft möglicherweise den Migrationsprozess manipulieren und eine gezielte Steuerung neu generierter Neuronen in durch degenerativ oder anderweitig geschädigte Areale herbeiführen zu können (Goh, Ma et al. 2003). Vorbild könnten hierbei hirneigene Mechanismen sein, die innerhalb des vergangenen Jahrzehnts identifiziert werden konnten. So konnten Studien u.a. durch Magavi et al. (2000) und Nakatomi et al. (2002) nachweisen, dass limitierte, lokalisierte neuronale Schädigung und Hypoxie die Neurogenese und den Ersatz geschädigter neuronaler Zellen im adulten zerebralen Kortex induzieren können (Magavi, Leavitt et al. 2000, Nakatomi, Kuriu et al. 2002). Das Ausmaß der resultierenden Funktionalität konnte hierbei noch nicht hinreichend nachgewiesen werden (Ming and Song 2005). Die durch die genannten Stimuli generierten Neuronen entstammen wahrscheinlich lokalen Vorläuferzellen aus neurogenen Arealen (v.a. periventrikulär) oder entstehen in Hirnarealen, die klassischerweise nicht zu den neurogenen Nischen gezählt werden (Nakatomi, Kuriu et al. 2002) und wandern in Folge in die geschädigten Gebiete ein. Alternative Theorien besagen, dass ruhende neuronale Stammzellen selbständig innerhalb des adulten Gehirns zielgerichtet wandern und vor Ort bedarfsgerecht Neuronen generieren können (Ghashghaei, Lai et al. 2007).

Die geschilderten Erkenntnisse sprechend zunehmend dafür, dass die lokalisierte, kurzstreckige Migration oder die isolierte Migration einzelner Neuronen vielversprechende Angriffspunkte für therapeutische Ansätze in der Zukunft darstellen (Ghashghaei, Lai et al. 2007). Demzufolge ist essentiell, dass neben der therapeutischen Manipulation von neuronalen Stammzellen zur Erzeugung gewünschter neuronaler Phänotypen auch Mechanismen erforscht werden über die eine lokale Navigation von ANSC zu gewünschten Arealen im adulten Gehirn gelenkt werden können (Ghashghaei, Lai et al. 2007).

4.2.1.3. Regulation der Migration

Die neurogenen Nischen im adulten Gehirn von Säugern sind von den Zielgebieten der migrierten Zellen durch ein komplexes und größtenteils inhibitorisches Milieu getrennt (Ghashghaei, Lai et al. 2007). Für eine erfolgreiche Wanderung neuronaler Vorläuferzellen zur entsprechenden Ziellokalisation ist demzufolge eine Steuerung erforderlich. Nach heutigen Erkenntnissen sind hierfür Interaktionen einer Vielzahl von Signalen nötig. Als Region mit der stärksten Rate an Neurogenese und nachfolgenden Migrationsbewegungen im adulten Gehirn dient die SVZ und der dazugehörige RMS als Prototyp für die Analyse molekularer Impulse zur Lenkung neuronaler Vorläuferzellen in Säugetieren (Ghashghaei, Lai et al. 2007).

Im Gegensatz zur Migration im entwickelndem Gehirn, die vorrangig durch Gliazellen und Axone geleitet wird, zeichnet sich die neuronale Migration im RMS dadurch aus, dass die Wanderung maßgeblich entlang von anderen neuronalen Vorläuferzellen in Form von sog. „neural chains“ geschieht (Ghashghaei, Lai et al. 2007). Nach der Generierung und initialen Differenzierung in der SVZ gleiten Neuroblasten in „neural chains“ innerhalb der RMS aneinander entlang in Richtung des Bulbus olfactorius (Ghashghaei, Lai et al. 2007). Aus der Tatsache, dass diese Bewegungen streng gerichtet und ohne Streuung in die umliegenden Gewebe erfolgt, lässt sich schlussfolgern, dass orientierende Signale innerhalb des RMS existieren müssen (Ghashghaei, Lai et al. 2007). Beobachtungen von Kirschenbaum et al. zufolge, lässt sich auch nach einer Ablation des Zielgebietes, dem Bulbus olfactorius eine gerichtete Migration im RMS nachweisen (Kirschenbaum, Doetsch et al. 1999). Auf Basis dieser Ergebnisse ließ sich ableiten, dass Signale aus dem Bulbus nicht unmittelbar für die gerichtete Migrationsbewegung erforderlich sind. Für die Herstellung essentieller Chemogradienten könnten vielmehr intrinsische oder in der unmittelbaren Umgebung befindliche Signale verantwortlich sein und somit die Migrationsbewegung innerhalb des RMS lenken (Kirschenbaum, Doetsch et al. 1999). Bisherige Studienergebnisse weisen hierbei auf eine Beteiligung der extrazellulären Matrix (ECM), sezernierter Mediatoren, Adhäsionsmolekülen und Tyrosin-Kinase bzw. Integrin-abhängigen Rezeptoren hin (Ghashghaei, Lai et al. 2007).

Die gerichtete Wanderung innerhalb des RMS könnte darüber hinaus durch Astroglia unterstützt werden. Diese umgeben die migrierenden Zellen in Form von „glial tubes“ und bilden insofern eine Grenze zu umgebenden Hirnstrukturen. Weiterhin existieren Hinweise darauf, dass umgebende Astrozyten Produktionsort eines sekretorischen Proteins mit migrations-induzierender Aktivität (MIA) sein könnten (Mason, Ito et al. 2001). Dem gegenüber stehen Ergebnisse, die eine verminderte Wanderungsgeschwindigkeit der Neuroblasten des RMS *in vitro* in Anwesenheit glialer Zellen demonstrieren (Mason, Ito et al. 2001). Im gliazell-freien Milieu des dreidimensionalen Migrationsassays mit Matrigel, der auch in dieser Arbeit verwendet wurde,

lassen sich darüber hinaus unphysiologisch hohe Wanderungsgeschwindigkeiten messen (Lim and Alvarez-Buylla 1999).

Insgesamt lassen diese Beobachtungen darauf schließen, dass astrogliale Zellen sowie das umgebende Milieu die sezernierten sowie substratgebundenen Signale bereitstellt, die für die gerichtete Wanderung der in der SVZ generierten Neuroblasten in den Bulbus olfactorius erforderlich sind (Ghashghaei, Lai et al. 2007). Während die hierfür verantwortlichen Mechanismen noch Bestand der Forschung sind, spielen hierbei dennoch höchstwahrscheinlich v.a. eine Beeinflussung der genetischen Transkription sowie der Ausrichtung zellulärer Strukturen der neuronalen Vorläuferzellen eine essentielle Rolle.

4.2.1.4. Methylenblau und postnatale Migration

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass MB die Migrationsbewegungen adulter neuronaler Stammzellen beeinflussen kann. Den Resultaten des in dieser Arbeit verwendeten Matrigel-Migrationsversuches zufolge, ist die Migration zu einem Medium mit MB im Vergleich zur Kontrolle bis um den Faktor 7 gesteigert. Vor dem Hintergrund der lokalen Steuerung der Migration durch eine Vielzahl chemoattraktiver Agenzien *in vivo*, stellt sich die Frage, ob MB ebensolche Kapazitäten *in vitro* besitzt bzw. welcher zellulärer Mechanismen es sich hierbei bedient.

MB konnte bisher eine Vielzahl von Einflüssen auf zelluläre Mechanismen nachgewiesen werden. Viele der Effekte scheinen hierbei eng mit den besonderen physiochemischen Eigenschaften wie dem Redoxpotential, Ladungen und Lichtabsorption/-anregbarkeit assoziiert zu sein (Oz, Lorke et al. 2011). Unter den „peripher“ lokalisierten Zielstrukturen befinden sich u.a. die NO-Synthase (Mayer, Brunner et al. 1993), Guanylylzyklase (Gruetter, Kadowitz et al. 1981), Methämoglobin und die Glutathionreduktase (Harvey, Duvenhage et al. 2010). Eine gute Permeabilität durch die Blut-Hirn-Schranke und die Affinität zu Nervengewebe bedingt, dass MB zusätzlich Wirkungen auf physiologische Prozesse des Nervensystems entfalten kann. Im zentralen und peripheren Nervensystem beeinflusst MB durch Effekte auf das cholinerge (Pfaffendorf, Bruning et al. 1997), monoaminerge (Ramsay, Dunford et al. 2007) und glutamaterge (Vutskits, Briner et al. 2008) System vielfältig neuronale Signalprozesse. Auch eine Modulation der Funktion von spannungsabhängigen Na⁺ (Kress, Petersen et al. 1997), Ca²⁺ (Thuneberg 1990) und Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanälen (Nemeth, Daly et al. 1985) konnte nachgewiesen werden. Unter den vielfältigen neuro-zellulären Mechanismen, die durch MB beeinflusst werden, befinden sich auch jene, die aktuell im Rahmen der Pathogenese der Alzheimerdemenz diskutiert werden.

Auch wenn die Wirkmechanismen MBs bisher noch nicht vollständig erforscht sind, ist MB u.a. in der Therapie von Methämoglobinämien, Ifosfamid-induzierter Enzephalopathie, Zyanidvergiftungen und dem vasoplegen Syndrom langfristig etabliert (Werner, Guo et al. 2013).

Nach der Kenntnis der Autorin dieser Arbeit liegen bisher keine Untersuchungen zum Einfluss der neuronalen Migration durch MB vor. Es existieren jedoch Untersuchungen zu Auswirkungen MBs auf das Migrationsverhalten anderer Zelltypen. Eine 2013 von Werner et al. publizierte Arbeit untersucht vor dem Hintergrund des postoperativen vasoplegen Syndroms und der therapeutischen Verwendung MBs bei dieser Indikationsstellung den Einfluss MBs auf die transendotheliale Migration peripherer Blutzellen (Werner, Guo et al. 2013). Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge, kann MB *in vitro* die Transmigration peripherer Blutzellen durch endotheliale Monolayer beeinflussen. Es konnte beobachtet werden, dass MB konzentrationsabhängig (v.a. 60 μ M) eine Steigerung der Migrationsrate von CD14+ Monozyten bewirkt. Andere Typen peripherer Blutzellen wurden nicht oder lediglich in geringem Ausmaß durch MB beeinflusst (Werner, Guo et al. 2013). Obwohl die Rolle von MB in der transendothelialen Migration peripherer Blutzellen noch nicht vollständig geklärt werden konnte, führten Werner et al. (Werner, Guo et al. 2013) die in ihrer Arbeit beobachteten Effekte MBs u.a. auf die Beeinflussung der NO-Synthase durch MB zurück. NO ist ein Signalmolekül, das u.a. in der Regulation der Immunantwort eine wichtige Rolle einnimmt und hierbei mitunter in die Adhäsion und Migration von Leukozyten involviert ist (Harbrecht, Wu et al. 1997, Scalia, Armstead et al. 1999). Andere Studien liefern Hinweise darauf, dass NO auch an essentiellen Prozessen der Angiogenese, einschließlich der hiermit verbundenen Adhäsions- und Transmigrationsprozesse beteiligt ist (Carreau, Kieda et al. 2011). Werner et al. leiten auf Basis dieser Erkenntnisse ab, dass MB über eine Beeinflussung des NO-Systems evtl. eine gesteigerte Adhäsion der peripheren Blutzellen und demzufolge eine höhere Rate der Transmigration bewirken kann (Werner, Guo et al. 2013).

Die Ergebnisse der zitierten Arbeit veranschaulichen, dass MB auch in anderen zellulären Systemen *in vitro* Einfluss auf Migrationsprozesse nehmen kann. Zusammen mit den Resultaten dieser Arbeit, stellt dies v.a. vor dem Hintergrund therapeutischer Überlegungen zur gezielten Lenkung neuronaler Zellen in krankheitsbedingt geschädigte Hirnareale (z.B. bei der AD) eine therapeutisch interessante Beobachtung dar. Ob der in dieser Arbeit beobachtete Effekt der gesteigerten Migration von ANSC zu MB-haltigem Medium sich vergleichbarer molekularer Mechanismen bedient, muss in nachfolgenden Untersuchungen weiter verfolgt werden. Zu beachten hierbei, dass in den Versuchen zu dieser Arbeit wesentlich geringere Dosierungen (100nM) als in den zitierten Untersuchungen verwendet wurden (60 μ M). Weitere Einschränkungen in der Vergleichbarkeit ergeben sich darüber hinaus durch die Verwendung nicht-neuronaler (hämatologischer) Zellen in der zitierten Arbeit.

Eine Identifizierung der pathophysiologisch relevanten Mechanismen MB's ist Ziel vielfältiger Forschungsbemühungen. Beobachtungen von Studien, die einen Einfluß des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) auf Prozesse der neuronalen Plastizität beschreiben, erscheinen im Zusammenhang

mit den weiteren Ergebnissen dieser Arbeit (v.a. die Beeinflussung der BACE-1 durch MB) besonders interessant (Breen, Bruce et al. 1991, Sabo, Ikin et al. 2001).

Das Protein APP und seine Abkömmlinge (v.a. A β) werden bereits langjährig in der Pathogenese der Alzheimer Demenz diskutiert. Eine Aggregation A β 's wird beispielsweise maßgeblich für die bei Patienten mit AD identifizierbaren, zytopathologischen Amyloid-Plaques verantwortlich gemacht. Heutzutage existieren jedoch auch Publikationen, die physiologische Effekte von APP beschreiben (Chen and Tang 2006). Beispielsweise konnten eine Beeinflussung der synaptischen Plastizität sowie der neuronalen Adhäsion (Breen, Bruce et al. 1991) und Motilität (Sabo, Ikin et al. 2001) im Rahmen wissenschaftlicher Untersuchungen identifiziert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten mit einem annähernd signifikanten Ergebnis eine Beeinflussung des Amyloidstoffwechsels durch MB an. Inwiefern die geschilderten Beobachtungen zur Migration mit der annähernd signifikanten Beeinflussung der BACE-1 durch MB im Zusammenhang stehen, kann anhand des Versuchsaufbaus dieser Arbeit nur vermutet werden. Interessant ist jedoch, wie stark sich das pathophysiologische Verständnis von Vorläufern des traditionell krankheitsassoziierten A β im vergangenen Jahrzehnt gewandelt hat. Eine Tatsache, die v.a. im Hinblick auf eine therapeutische Verwendung von Hemmern des Amyloidstoffwechsels in der Therapie der AD relevant erscheint.

4.2.2. Methylenblau und der Amyloidstoffwechsel

Methylenblau ist ein medizinisch langjährig etablierter Wirkstoff, der in den vergangenen Jahren v.a. basierend auf Forschungsergebnissen von Wischik zunehmend in der Therapie der AD diskutiert wird (Wischik, Edwards et al. 1996, Gura 2008).

MB ist u.a. wegen seiner geringen Toxizität (Riha, Bruchey et al. 2005), guter ZNS-Gängigkeit (Walter-Sack, Rengelshausen et al. 2009) sowie einer bereits langjährigen Zulassung für medizinische Indikationen ein attraktives therapeutisches Agens. Die positiven Effekte MBs auf den Krankheitsverlauf der AD wurden zunächst vornehmlich auf die nachweislich lytische Wirkung des Farbstoffs auf intrazelluläre Tau-Aggregate zurückgeführt (Wischik, Edwards et al. 1996, Taniguchi, Suzuki et al. 2005). Nachfolgende Forschungsarbeiten konnten das bekannte Wirkungsspektrum um bedeutende Erkenntnisse erweitern, sodass aktuell von einer Beeinflussung multipler zellulärer Mechanismen durch MB ausgegangen wird. Nach dem heutigen Verständnis beeinflusst MB zusätzlich zu der Tau-Aggregation weitere bedeutende, neuropathologische Charakteristika der Alzheimer Demenz wie u.a. den Amyloid-Stoffwechsel (Necula, Breydo et al. 2007), das cholinerge Transmittersystem (Kucukkilinc and Ozer 2007) sowie mitochondriale Funktionen (Atamna and Kumar 2010).

Die bisherigen Erkenntnisse über die Interaktion von MB und Amyloid konzentrieren sich vornehmlich auf die multiplen Aggregationsformen von A β . Untersuchungen dieser Fragestellung konnten unterschiedliche Effekte aufzeigen. Studien von Taniguchi et al. zeigten inhibitorische Effekte MBs auf die Fibrillenformation durch A β_{40} *in vitro* (Taniguchi, Suzuki et al. 2005). Ergebnisse von Necula et al. legen nahe, dass MB die Bildung von fibrillärem A β_{42} steigert und die Formation der neurotoxischen Amyloid-Oligomere inhibiert (Necula, Breydo et al. 2007).

Auch die Ergebnisse dieser Arbeit könnten eine mögliche Beeinflussung des zellulären Amyloidstoffwechsels durch therapeutische Konzentrationen an Methylenblau (100nM) anzeigen. Im Unterschied zu den bisherigen Erkenntnissen über die Interaktionen von MB mit unterschiedlichen Konfigurationsformen aggregierten Amyloids (s.o.) deuten die in dieser Arbeit gewonnenen Resultate auf eine Beeinflussung der BACE-1 durch MB hin. Eine Kultivierung im MB-haltigen Medium (100nM) resultierte in dieser Arbeit in einer annähernd signifikanten ($p = 0.060$) Expressionssteigerung der BACE-1 in ANSC. Die Ergebnisse der quantitativen Analyse zeigen dementsprechend ein mögliches Eingreifen von MB in den Amyloidstoffwechsel vor der Entstehung potentiell neurotoxischer A β -Aggregate, an.

Eine potentiell expressionssteigernde Wirkung MBs auf die BACE-1 *in vitro* bei gleichzeitig erwiesenen positiven Auswirkungen MBs auf die kognitive Leistungsfähigkeit *in vivo* stellt das „konventionelle“ Verständnis der BACE-1 in der Pathogenese der AD in Frage (Wischik and Staff 2009).

Die Ergebnisse lassen sich in dieser Eigenschaft in Einklang bringen mit alternativen Forschungsergebnissen, die die ausschließlich pathologische Rolle der BACE-1 in der AD kritisch diskutieren und potentiell kognitionsfördernde Wirkungsmechanismen des Enzyms sowie seiner Spaltprodukte aufzeigen (Ma, Lesne et al. 2007).

4.2.2.1. BACE-1 - „Konventionelles Verständnis“

BACE-1 ist ein zentrales Enzym im Stoffwechsel des APP (Amyloid Precursor Protein). Durch die enzymatische Prozessierung des transmembranären APP trägt BACE-1 zur Entstehung von sAPP β sowie dem membrangebundenen Oligopeptid C99, bei. Als Produkte der nachfolgenden Spaltung von C99 durch eine γ -Sekretase entstehen A β_{40} bzw. A β_{42} sowie die AICD (APP intracellular domain).

BACE-1 stellt ein im Rahmen der „Amyloid-Hypothese“ der AD viel diskutiertes Protein dar. Die „Amyloid-Hypothese“ beschreibt ein wissenschaftliches Modell zur Pathogenese der AD in dem aggregiertes Amyloid β (A β) maßgeblich für die krankheitstypischen Pathologien verantwortlich gemacht wird. Die hohe Relevanz dieser Hypothese bedingte in der Vergangenheit eine intensive Erforschung potentiell toxischer Effekte durch A β (Puzzo, Privitera et al. 2008) sowie weiteren Spaltprodukten des Amyloid-Precursor-Proteins (APP). Studien zu dieser Fragestellung lieferten Anhalt dafür, dass abnormal hohe Konzentrationen an A β eine Einschränkung von Gedächtnis-,

sowie Synapsenfunktionen bewirken können (Haass and Selkoe 2007, Puzzo, Privitera et al. 2008). Des Weiteren konnten hohe Konzentrationen an A β sowie AICD -ein weiteres u.a. durch die enzymatische Aktivität der BACE-1 entstehendes APP-Spaltprodukt- negative Auswirkungen auf die Prozesse der adulten Neurogenese bewirken (Zhou, Chan et al. 2011). Dem unabhängig von BACE-1 entstehenden APP-Produkt sAPP α (soluble APP α) konnte im Rahmen vergleichbarer Untersuchungen unerwartet eine „neuroprotektive“ Wirkung mit Steigerung der Synaptogenese und proliferationsfördernden Wirkungen auf ANSC nachgewiesen werden (Mattson 1997, Zhou, Chan et al. 2011).

Aus den geschilderten Erkenntnissen resultierte im Folgenden eine „konventionelle“ Sichtweise, die dem BACE-unabhängigen sAPP α einen hohen Stellenwert in der physiologischen Entwicklung des ZNS zusprach. Amyloid β und AICD wurden hingegen als ausschließlich pathologische „Abfallprodukte“ des sAPP α -generierenden Stoffwechselweges angesehen (Puzzo, Privitera et al. 2008). Durch den essentiellen Beitrag zur Entstehung von A β sowie AICD wurde die BACE-1 als attraktive therapeutische Zielstruktur identifiziert und die Anwendungsmöglichkeiten einer medizinischen Enzymhemmung in der Behandlung der AD eruiert (Vassar, Kovacs et al. 2009).

4.2.2.2. BACE-1 - „Alternative Hypothesen“

Heutzutage existiert eine zunehmende Anzahl von Studien, die eine ausschließlich pathologische Funktion der BACE-1 sowie ihrer Spaltprodukte in Frage stellen (Yankner, Duffy et al. 1990, Lopez-Toledano and Shelanski 2004, Laird, Cai et al. 2005, Ma, Lesne et al. 2007, Puzzo, Privitera et al. 2008, Wang, Song et al. 2008). Forschungsergebnisse weisen zunehmend auf eine mögliche physiologische Rolle der genannten Proteine hin. Beispielsweise konnten eine u.a. von der synaptischen Aktivität abhängige Freisetzung A β 's in gesunden Gehirnen (Cirrito, May et al. 2003, Puzzo, Privitera et al. 2008) sowie eine Steigerung der APP-Expression während Differenzierungsprozessen und Neuronenwachstum gezeigt werden (Salbaum and Ruddle 1994, Arancio and Chao 2007). Neuregulin-1 (NRG-1) einem weiteren Spaltprodukt der BACE-1 (Hu, Hicks et al. 2006), konnte in Studien u.a. eine Beteiligung an der Formation und Plastizität von Synapsen, der neuronalen Migration sowie der Regulierung der Neurotransmitterfunktion nachgewiesen werden (Falls 2003).

Studien zur Simulation einer suffizienten Inhibitortherapie der BACE-1, einer zunächst überaus vielversprechenden Option in der Therapie der AD, legen eine essentielle Rolle von BACE-1 sowie der von ihr generierten APP-Spaltprodukte, nahe (Laird, Cai et al. 2005, Ma, Lesne et al. 2007, Wang, Song et al. 2008). Studien von Wang et al. (Wang, Song et al. 2008) und Laird et al. (Laird, Cai et al. 2005) konnten demonstrieren, dass Mäuse mit einem knock-out für BACE-1 neben einer vollständigen Suppression von A β signifikante Defizite in der synaptischen Plastizität des Hippokampus mit einer dramatischen Reduktion der Long-Term-Potentiation (LTP) aufweisen. Die LTP gilt als essentieller zellulärer Mechanismus für Lern- und Gedächtnisprozesse (Bliss and

Collingridge 1993). Die Erkenntnisse stehen insofern im Einklang mit weiteren Resultaten der genannten Studien, denen zufolge Mäuse mit einem knock-out für BACE-1 eine signifikant geminderte Leistungsfähigkeit in kognitiven sowie emotionalen Tests zeigen (Laird, Cai et al. 2005, Wang, Song et al. 2008).

In Anbetracht einer Vielzahl an bekannten Substraten der BACE-1 (Li and Sudhof 2004) stellt sich die Frage, inwiefern auch Stoffwechselwege abseits von APP an den beobachteten Effekten auf kognitive Prozesse beteiligt sein könnten (Laird, Cai et al. 2005). Für eine wesentliche Beteiligung der Amyloid-Spaltprodukte A β und AICD sprechen u.a. Ergebnisse von Laird et al. (Laird, Cai et al. 2005). Sie konnten in ihren Versuchen mit Hilfe einer transgenen Überexpression von APP und Presenilin (γ -Sekretase, spaltet A β sowie AICD aus C99, s. Abb. 1) eine signifikante Verbesserung der kognitiven Defizite von BACE knock-out Mäusen herbeiführen.

Die geschilderten Resultate liefern einen überzeugenden Anhalt dafür, dass BACE-1 sowie die von ihr generierten APP-Spaltprodukte einen essentiellen Stellenwert in kognitiven, emotionalen sowie synaptischen Funktionen einnehmen (Laird, Cai et al. 2005). Diese Theorie steht im Einklang mit aktuellen Forschungsbemühungen, die infolge des breiten Nebenwirkungsspektrums einer vollständigen Hemmung der BACE-1 Potentiale einer partiellen Reduktion der BACE-1-Enzymaktivität in der Therapie der AD prüfen (Vassar, Kovacs et al. 2009).

4.2.2.3. Vereinbarkeit der Studienergebnisse mit „Alternativen Hypothesen“ zu BACE-1

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen bei einer annähernd signifikanten Steigerung der zellulären Expressionsrate eine potentielle Konzentrationserhöhung der BACE-1 durch den Einfluss von MB auf ANSC, nahe. In Zusammenschau mit Ergebnissen klinischer Untersuchungen, die eine positive Wirkung MBs auf die kognitive Leistungsfähigkeit *in vivo* demonstrieren, sind die Resultate dieser Arbeit nicht mit dem konventionellen Verständnis der BACE-1 in der Pathogenese der AD zu vereinbaren. Alternative Theorien, die eine essentielle Beteiligung der BACE-1 sowie ihrer Spaltprodukte an kognitiven Prozessen postulieren (Laird, Cai et al. 2005, Wang, Song et al. 2008), könnten jedoch zur Erklärung der beobachteten Effekte herangezogen werden.

Studien von Laird et al. (Laird, Cai et al. 2005) und Wang et al. (Wang, Song et al. 2008) lassen Aussagen über die negativen Effekte einer Suppression der BACE-1 auf kognitive Funktionen zu. Die Ergebnisse legen in dieser Eigenschaft eine essentielle Rolle der BACE-1 in der Physiologie des ZNS nahe. Direkte Schlussfolgerungen über mögliche positive Konsequenzen einer Aktivitätssteigerung -wie im Falle dieser Arbeit diskutiert- werden anhand der Ergebnisse jedoch nicht ermöglicht. Überlegungen dieser Art werden darüber hinaus erschwert durch die Tatsache, dass die neurotoxischen Auswirkungen übermäßig hoher Konzentrationen an A β (Haass and Selkoe 2007, Puzzo, Privitera et al. 2008) sowie AICD (Haughey, Liu et al. 2002, Ghosal, Stathopoulos et al. 2010, Zhou, Chan et al. 2011) bereits hinreichend wissenschaftlich belegt werden konnten.

Die Auswertung der quantitativen Analyse konnte in dieser Arbeit einen ca. 1.4-fachen Anstieg der zellulären Expression des BACE-1-Gens durch eine Behandlung mit MB anzeigen. Unter der Voraussetzung einer unveränderten Funktionsweise, könnte die genannte Expressionssteigerung in einer ca. 1.4-fachen Konzentrationszunahme des Enzyms und (bei ausreichender Verfügbarkeit von APP und der γ -Sekretase) seiner Spaltprodukte resultieren. Unter genannten Voraussetzungen würde sich die Konzentration der Spaltprodukte durch die Auswirkungen MB's lediglich geringfügig (Faktor 1.4) von denen der unbehandelten Kontrollgruppe unterscheiden.

Im Gegensatz zu den vielfach belegten neurotoxischen Effekten abnormal hoher Konzentrationen A β 's konnten u.a. Untersuchungen von Puzzo et al. (Puzzo, Privitera et al. 2008) potentiell kognitionsfördernde Wirkungen geringer Mengen A β 's anzeigen. Puzzo et al. konnten den Studienergebnissen zu Folge eine signifikante Steigerung der hippocampalen LTP durch picomolare Konzentrationen (max. Effekt bei ca. 200pM) an A β demonstrieren. Die genannten Beobachtungen gingen einher mit signifikanten Leistungssteigerungen in ausgewählten Gedächtnisfunktionen (Referenz-, sowie Angstgedächtnis) der mit 200pM A β behandelten Mäuse (Puzzo, Privitera et al. 2008). Über einen kognitionsfördernden Effekt niedrigmolarer Konzentrationen hinaus konnten die Untersuchungen von Puzzo et al. neurotoxische Effekte nanomolarer Konzentrationen A β 's demonstrieren (Puzzo, Privitera et al. 2008). Eine Verabreichung von 200nM A β resultierte in ihrer Arbeit in einer signifikanten Abnahme der synaptischen Potenzierung (Puzzo, Privitera et al. 2008).

Die Ergebnisse von Puzzo et al. legen glaubhaft eine Wirkungsweise A β 's nahe, in der niedrige Konzentrationen eine bisher unbeachtete positiv-regulierende Funktion auf Prozesse der Neurotransmission und Gedächtnis ausüben. Hohe Konzentrationen A β 's zeigen hingegen den bekannten, negativ-modulierenden Mechanismus auf kognitive Prozesse (Puzzo, Privitera et al. 2008). A β demonstriert diesen Erkenntnissen zufolge eine Wirkung, die Puzzo und Arancio 2013 als „Dr. Jekyll/Mr. Hyde“ bezeichneten (Puzzo and Arancio 2013).

Eine derartige Funktionsweise A β 's könnte zur Erklärung der Resultate dieser Arbeit herangezogen werden. Auf Basis der beobachteten Expressionssteigerung der BACE-1 wird in dieser Arbeit eine mögliche Konzentrationszunahme A β 's um den Faktor 1.4 postuliert. Studienergebnissen von Puzzo et al. (Puzzo, Privitera et al. 2008) zufolge, besitzt eine geringfügige Konzentrationserhöhung A β 's *in vivo* die Potenz, kognitionsfördernde Effekte herbeizuführen. Eine geringfügige Zunahme A β 's um den Faktor 1.4 *in vitro* stünde demzufolge in keinem unmittelbaren Widerspruch zu den Beobachtungen klinischer Studien, die kognitionsfördernde Potentiale einer Therapie mit MB *in vivo* anzeigen (Wischik and Staff 2009). Zu beachten ist

dennoch, dass Aussagen über kognitive Effekte anhand einer Kultivierung von ANSC in einer Zellkultur nicht möglich sind und durch klinische Studien gewonnen werden müssen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Puzzo et al. können die Untersuchungen dieser Arbeit keinen Hinweis auf eine veränderte synaptische Plastizität anzeigen. Das für die Fähigkeit zur Synapsenbildung stellvertretend gewählte Protein Synaptophysin zeigte keine signifikant veränderte Expressionsrate zwischen den Versuchsgruppen dieser Arbeit. Die durch Puzzo et al. beschriebenen Auswirkungen A β 's auf die LTP konnten aufgrund des in dieser Arbeit gewählten Versuchsaufbaus mit undifferenzierten neuronalen Stammzellen *in vitro* nicht nachvollzogen werden. Im Gegensatz zu differenzierten Zellen bilden undifferenzierte Zellen keine Synapsen aus. Eine mögliche Beeinflussung der LTP durch eine Therapie mit MB müsste demnach in der Zukunft anhand von (differenzierten) neuronalen Zellen *in vivo* dargestellt werden.

Zusätzlich zu einer Beeinflussung der LTP existieren Hinweise auf alternative Mechanismen, über die A β positive Effekte auf die Kognition entfalten könnte. Beispielsweise konnten Untersuchungen von Yankner et al. (Yankner, Duffy et al. 1990) sowie Lopez-Toledano und Shelanski (Lopez-Toledano and Shelanski 2004) erstmals positive Effekte niedrigmolarer Konzentrationen A β 's auf undifferenzierte neuronale Vorläuferzellen demonstrieren. Derartige Studienergebnisse deuten an, dass A β selektiv auch die Prozesse der adulten Neurogenese, einem wichtigen Mechanismus in der Pathogenese der AD, beeinflussen kann. Sie stellen in dieser Eigenschaft überaus relevante Quellen für die Fragestellung dieser Arbeit nach möglichen Effekten MB's auf das Verhalten von ANSC, dar.

4.2.2.4. Wirkungsweise Methylenblaus' in der Alzheimerdemenz - Erklärungstheorien

Kognitionsfördernde Effekte einer Therapie mit MB könnten für *gesunde Probanden* durch die im Vorfeld erwogenen Auswirkungen einer geringfügigen Expressionssteigerung der BACE-1 suffizient erklärt werden. Eine Erklärung derartiger Effekte Methylenblaus in *Patienten mit AD* gestaltet sich im Gegensatz dazu problematischer. Während „gesunde“ Gehirne über einen balancierten Amyloid-Stoffwechsel mit physiologisch-niedrigen Konzentrationen A β 's verfügen, liegen bei AD Patienten Dysregulationen mit teilweise erheblichen Erhöhungen der BACE-1 vor. Über die pathogenetische Bedeutung der geschilderten Konzentrationserhöhungen besteht aktuell noch Unklarheit. Einer Vielzahl der Theorien zufolge resultiert die Erhöhung der BACE-1 jedoch in einer Überproduktion und Akkumulation neurotoxischer Aggregationsformen A β 's und trägt somit essentiell zur Pathogenese der AD bei (Vassar, Kovacs et al. 2009). Positive Effekte einer zusätzlichen Expressionssteigerung der BACE-1 (wie z.B. durch eine Therapie mit MB) sind unter diesen Bedingungen nur eingeschränkt nachvollziehbar.

Eine mögliche Erklärung für die geschilderte Problematik basiert auf Untersuchungen durch Necula et al. (Necula, Breydo et al. 2007). Ihre Studienergebnisse konnten anzeigen, dass MB die

Bildung von fibrillärem A β ₄₂ steigert, die Formation der neurotoxischen Amyloid-Oligomere hingegen effizient inhibiert (s.o.). Basierend auf den geschilderten Ergebnissen könnte eine Hypothese aufgestellt werden, die eine Expressionssteigerung der BACE-1 durch MB mit kognitionfördernden Effekten einer MB-Therapie in Patienten mit AD in Einklang bringen könnte. Der Hypothese zufolge könnte MB über eine Expressionssteigerung der BACE-1 und konsekutiv erhöhten Konzentrationen an A β neurotrophe Effekte auf ANSC entfalten. MB könnte über den geschilderten Mechanismus zur Entstehung von Neuronen und somit zur Verlangsamung des u.a. durch massiven Neuronenverlust entstehenden Krankheitsprozesses der AD beitragen. Die bekannten, neurotoxischen Effekte hoher Konzentrationen an A β -Oligomeren auf Neuronen könnten hingegen durch die von Necula et al. (2007) propagierten hemmenden Eigenschaften MB's auf die Oligomerbildung unterbunden werden. In Kombination könnten die geschilderten Mechanismen somit zu einer gesteigerten Neurogeneserate beitragen, ohne gleichzeitig die neurotoxischen Wirkungen oligomerischen A β 's zu verstärken.

Obwohl eine Vielzahl von Studien auf die neuroprotektiven Potentiale A β 's hindeutet, muss in Anbetracht der Vielfalt an Substraten der BACE-1 jedoch auch ein A β -unabhängiger Mechanismus für die essentiellen Effekte des Enzyms in der Physiologie des ZNS in Erwägung gezogen werden. Eine Unabhängigkeit der kognitionsfördernden Effekte der BACE-1 von A β -Konzentrationen würde indirekt auch einen -von der in dieser Arbeit geschilderten Hypothese abweichenden-Wirkmechanismus MB's nahelegen. Beispielsweise konnte auch Neuregulin 1 (NRG1), ein APP-unabhängiges Spaltprodukt der BACE-1 (Hu, Hicks et al. 2006) mit Prozessen der Formation und Plastizität von Synapsen, neuronaler Migration sowie Myelinisierung von peripheren und zentralen Axonen identifiziert werden (Falls 2003). Eine Expressionssteigerung der BACE-1 könnte demzufolge auch über diesen Mechanismus potentiell kognitionsfördernde Effekte hervorrufen.

Bei einer unveränderten Kinetik der BACE-1 stellt sich jedoch auch bei dieser Hypothese die Frage, inwiefern die potentiell neurotrophischen Effekte des BACE-1-Spaltprodukts gegenüber den nachweislichen Nachteilen exzessiv erhöhter Konzentrationen an A β überwiegen können.

4.3. Limitationen und technische Einschränkungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren eine signifikant gesteigerte Migrationstendenz der murinen ANSC zu MB *in vitro* und legen insofern eine Beeinflussung neuroplastischer Mechanismen durch MB nahe. Limitationen in der Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf humane Modelle ergeben sich u.a. aus Erkenntnissen über die Migration und Neurogenese in Menschen im Vergleich zu Nagetieren.

Das Ausmaß neuronaler Migration im Gehirn von Wirbeltieren hat im Rahmen der Evolution zunehmend abgenommen (Font, Desfilis et al. 2001, Grandel, Kaslin et al. 2006). Obwohl

neurogene Nischen und eine aktive SVZ im adulten Gehirn des Menschen wissenschaftlich identifiziert werden konnten, liegen im Gegensatz zu tierischen Modellen bislang jedoch keine sicheren Hinweise auf langstreckige, gerichtete Migrationsprozesse im adulten Gehirn vor (Palmer, Schwartz et al. 2001). Eine langstreckige Migration scheint in der menschlichen Großhirnrinde u.a. durch das umgebende, inhibitorische Milieu erschwert zu sein. Eine kurzstreckige Migration innerhalb der neurogenen Nischen oder Migration einzelner Neuroblasten innerhalb des menschlichen Vorderhirns konnte jedoch nachgewiesen werden (Quinones-Hinajosa, Sanaï et al. 2006). Eine weitere Limitation für die Interpretation im Rahmen dieser Arbeit ergibt sich daraus, dass Migrationsprozesse innerhalb des pathophysiologisch für die AD relevanten Hirnareals, dem Hippokampus, im Vergleich zur SVZ nur eingeschränkt erforscht sind. Überlegungen zum eventuellen therapeutischen Einsatz in der AD sind auf dieser Grundlage noch weiter erschwert.

Weiterhin wird durch die Resultate dieser Arbeit eine annähernd signifikante Expressionserhöhung der BACE-1 durch eine Therapie muriner ANSC mit MB nahegelegt ($p = 0.060$). Auf Grundlage der zuvor geschilderten Erkenntnisse wissenschaftlicher Studien (s.o.) wurde bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit demzufolge ein BACE-1-vermittelter, fördernder Effekt MB's auf Prozesse der adulten Neurogenese erwogen.

Eine potentiell neurotrophe Wirkung MB's könnte zu den kognitionsfördernden Effekten in klinischen Studien (Wischik and Staff 2009) beitragen und würde das bisher bekannte Wirkungsspektrum MB's um eine in der Therapie der AD wichtige Komponente erweitern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können ausschließlich einen Trend anzeigen, auf dessen Grundlage derartige Wirkungen MB's hypothetisiert werden können. Zur potentiellen Bestätigung der aufgestellten Hypothese sind nachfolgende Untersuchungen erforderlich. Derartige Untersuchungen müssten u.a. zwei nicht belegte Annahmen in der Interpretation der Resultate dieser Arbeit hinreichend bestätigen: eine *signifikante* Beeinflussung der Expression der BACE-1 durch MB (1) sowie eine konsekutive Erhöhung der APP-Spaltprodukte, insbes. A β (2).

Zu 1) Die Ergebnisse der quantitativen Analyse zeigen mit einem Wert von $p = 0.060$ eine annähernd signifikante Steigerung in der Expression der BACE-1 durch den Einfluss von MB an. Eine *signifikante* Beeinflussung des Expressionsverhaltens durch MB müsste in nachfolgenden Arbeiten u.a. durch die Analyse einer erhöhten Anzahl ($>n=5$) an Untersuchungsproben bestätigt werden.

Zu 2) Bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit wird vorausgesetzt, dass eine Expressionssteigerung der BACE-1 (Faktor 1,4) durch MB in einer 1,4-fachen Erhöhung des APP-Spaltproduktes A β resultiert. Auch zur Bestätigung dieser Annahme wären nachfolgende Untersuchungen erforderlich. Zunächst müsste demonstriert werden, dass die durch MB hervorgerufene Transkriptionssteigerung des BACE-1-Gens in einer „gleichförmigen“

Konzentrationserhöhung des zellulären Enzyms resultiert. Hierfür wäre in nachfolgenden Arbeiten zusätzlich zu den quantitativen Expressionsraten des BACE-1-Gens die Erhebung der Konzentrationen des zellulären Enzyms erforderlich. Im Falle einer -der gesteigerten Expressionsrate entsprechenden- Konzentrationszunahme der BACE-1 müsste des Weiteren untersucht werden inwieweit diese in einer gleichförmigen Zunahme der APP-Spaltprodukte (v.a. A β 's) resultiert. Studien zur Untersuchung der Pathogenese der AD legen nahe, dass eine erhöhte Konzentration der BACE-1 in einer Erhöhung der APP-Metabolite resultiert (Vassar, Kovacs et al. 2009). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wird in der Auswertung dieser Arbeit eine konsekutive Konzentrationserhöhung A β 's vorausgesetzt. In Anbetracht der weiteren bekannten Stoffwechselwege der BACE-1 wäre es in nachfolgenden Arbeiten jedoch erforderlich, die Konzentrationserhöhung A β 's als Folge einer Zunahme der zellulären BACE-1 durch Konzentrationsmessungen zu bestätigen.

Anhand der Resultate des Boyden-Chamber Assay kann diese Arbeit eine signifikante Beeinflussbarkeit der Neuroplastizität von ANSC durch MB anzeigen, die potentiell therapeutisch genutzt werden könnte. Diese Eigenschaft MBs *in vitro* ist v.a. im Kontext von Überlegungen zur therapeutischen Steuerung neuronaler Vorläuferzellen in Richtung geschädigter Hirnareale *in vivo* in der Zukunft relevant.

Eine unmittelbare Beeinflussung der Stammzellproliferation oder -differenzierung durch MB kann mit den Untersuchungsergebnissen dieser Arbeit nicht demonstriert werden. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Lopez-Toledano und Shelanski (Lopez-Toledano and Shelanski 2004) zeigte diese Arbeit keine signifikanten Veränderungen im langzeitigen Proliferationsverhalten der ANSC. Die, im Rahmen der Untersuchungen von Lopez-Toledano und Shelanski geschilderte, signifikante Steigerung der Differenzierung zu neuronalen Zellen konnte anhand des Versuchsaufbaus dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden. Potentiell fördernde Effekte MB's auf die neuronale Differenzierung von ANSC stellen eine vielversprechende Wirkungsweise MB's dar und müssten im Rahmen nachfolgender Arbeiten untersucht und ggf. quantifiziert werden.

Limitationen dieser Arbeit ergeben sich des Weiteren aus der Verwendung muriner Zellen *in vitro*. Komplexe neurologische Effekte wie Kognition etc. können nicht durch ein Modell *in vitro* simuliert und analysiert werden. Der gewählte Versuchsaufbau resultiert demzufolge in einer eingeschränkten Übertragbarkeit der erhobenen Effekte auf mögliche Auswirkungen einer Therapie mit MB in Patienten mit der Alzheimerdemenz. Für vergleichbare Aussagen sind Untersuchungen *in vivo* wie z.B. klinische Studien an Alzheimer-Patienten erforderlich.

4.4. Ausblick

Im Jahr 2012 gilt die AD als eine der volkswirtschaftlich relevantesten Erkrankungen des alternden Menschen (Corbett, Smith et al. 2012). Die steigende Inzidenz in den Ländern der westlichen Welt

wird in der Zukunft eine große Herausforderung für Sozial-, und Gesundheitskassen darstellen (Gerald and Ockert 2013). Etablierte Therapeutika können lediglich eine symptomatische Linderung der dementiellen Beschwerden bewirken, eine kausale Therapie der Erkrankung ist bisher nicht möglich. Wissenschaftliche Fortschritte im Verständnis der Pathogenese sowie in der Diagnostik und Therapie des dementiellen Erkrankungsbilds werden infolgedessen dringend erforderlich.

2008 präsentierte Claude Wischik beim jährlichen Treffen der Alzheimer Gesellschaft in Chicago Ergebnisse einer Phase-2 Studie. Den Studienergebnissen zufolge konnte eine 6-monatige Therapie mit MB signifikante Verbesserungen der kognitiven Leistungsfähigkeit von Patienten mit AD bewirken. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse propagierte Wischik 2008 erstmals ein vielversprechendes Potential des medizinisch langjährig etablierten Farbstoffs MB in der medikamentösen Behandlung der Alzheimer Demenz und erregte damit weltweit Aufsehen.

Ein antidementieller Effekt MB's in Phase-3 Studien wird derzeit hoffnungsvoll erwartet. Der Mechanismus, über den MB seine potentiell positiven Effekte entfaltet, verbleibt derweil jedoch Thema der wissenschaftlichen Diskussion. Über die von Wischik propagierte, lytische Wirkung auf Tau-Aggregate hinaus konnten Arbeitsgruppen Effekte MB's auf weitere, in der Pathogenese der AD vielfach diskutierte, Mechanismen nachweisen wie u.a A β (Necula, Breydo et al. 2007), das cholinerge Transmittersystem (Kucukkilinc and Ozer 2007) und mitochondriale Dysfunktionen (Atamna and Kumar 2010). Andere Forschungsarbeiten legen regulative Einflüsse auf Proteine nahe, die bisher mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden konnten wie z.B. TDP-43, Huntingtin und α -Synuclein (Landhuis 2012, Sontag, Lotz et al. 2012). Darüber hinaus konnten weitere zelluläre Prozesse identifiziert werden (Proteasomen, Autophagolyse), die unter einer Therapie mit MB Veränderungen aufweisen, sodass heutzutage vorrangig von einer Vielzahl pleiotroper Effekte MB's ausgegangen wird (O'Leary, Li et al. 2010).

Diese Arbeit propagiert einen möglichen Effekt MB's auf die Prozesse der adulten Neurogenese und Neuroplastizität und erwägt demzufolge bisher noch nicht beschriebene zelluläre Wirkungen MB's. Die propagierten Wirkungen MB's müssten mit Hilfe nachfolgender Studien hinreichend belegt werden. Ein potentiell neurotropher/ neuroplastischer Effekt würde das bekannte Wirkungsspektrum MB's jedoch um eine vielversprechende Facette bereichern. Gelänge der Nachweis einer BACE-vermittelten, differenzierungssteigernden Wirkung MB's in nachfolgenden Studien, müssten sich weitere Fragen u.a. zum zellulären Wirkungsmechanismus sowie zu den langzeitigen Folgen einer möglicherweise BACE-1-steigernden Therapie in der AD anschließen.

MB wird in den nächsten Jahren seine möglicherweise positiven Einflüsse auf den Verlauf der AD beweisen müssen, bevor eine breite klinische Anwendung in dieser Indikation denkbar wird. Bisher konnte jedoch vielfach belegt werden, dass MB eine große Anzahl bekannter zellulärer

Mechanismen beeinflusst, die teilweise als kausal für die Pathogenese der AD diskutiert werden. Der seit Jahrzehnten etablierte Farbstoff MB stellt in dieser Eigenschaft einen Hoffnungsträger für die Therapie der AD in der Zukunft dar.

Die in dieser Arbeit propagierte potentielle Beeinflussung adulter neuronaler Stammzellen bereichert die bisher bekannten Effekte MB's um eine vielversprechende Option. Dysregulationen der adulten Neurogenese und Neuroplastizität werden aktuell in der Pathogenese der AD sowie in weiteren neurodegenerativen Erkrankungen intensiv diskutiert. Möglicherweise könnte MB u.a. über eine Stimulation der adulten Neurogenese und nachfolgender Migration in der Zukunft das bisher enge Spektrum der AD-Therapien um eine effektive Option bereichern.

Zusammenfassung

Über viele Jahrzehnte galt das zentrale Nervensystem als regenerationsunfähiges Gewebe. Heutzutage ist bekannt, dass umschriebene Areale des Gehirns von Säugetieren auch in postnatalen Stadien zur Neurogenese befähigt sind. Obwohl die adulte Neurogenese im Menschen limitiert zu sein scheint, wird sie zunehmend im Zusammenhang mit der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen diskutiert. Sie gilt vor allem im Hinblick auf die steigende Prävalenz dieser Krankheiten in den Ländern der westlichen Welt als vielversprechendes und nachhaltiges therapeutisches Angriffsziel.

Ziel dieser Arbeit war, einen möglichen Einfluss von Methylenblau (Tetramethylthioninchlorid) auf das Verhalten adulter neuronaler Stammzellen (ANSC) der Maus zu untersuchen. Methylenblau (MB) ist ein therapeutisches Agens, das bereits langjährig und sicher bei einer Vielzahl medizinischer Indikationen Anwendung findet. Basierend auf klinischen Studien durch Claude Wischik wird MB in den vergangenen Jahren zunehmend in der Therapie der Alzheimer Demenz diskutiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Aspekte des Verhaltens von ANSC untersucht. Hierfür wurden das Kurz- und Langzeitwachstum, die Expression ausgewählter Gene sowie die gerichtete Migration von ANSC unter dem Einfluss von MB erhoben. Die Versuche dieser Arbeit konnten zeigen, dass MB signifikant auf Prozesse der Neuroplastizität wirkt. Die Ergebnisse des Migrationsassays demonstrieren, dass MB eine Steigerung der gerichteten Migration der ANSC im Vergleich zur Kontrolle bewirkt. Nach Kenntnis der Autorin ist dies die erste Arbeit, die eine Beeinflussung des Migrationsverhaltens von ANSC durch MB demonstrieren kann. Diese Wirkungsweise MBs erscheint insbesondere vor dem Hintergrund von therapeutischen Überlegungen zur gezielten Lenkung neu generierter Neuronen in krankheitsbedingt geschädigte Hirnareale vielversprechend. Weiterhin konnte mit einem Ergebnis, das sich dem Signifikanzniveau annähert, eine mögliche Beeinflussung des Amyloidstoffwechsels durch MB angezeigt werden. Die Expressionsanalysen des Amyloid-produzierenden β -Amyloid-Cleaving-Enzyme-1 (BACE-1) deuten eine Erhöhung nach einer Kultivierung von ANSC in einem MB-haltigen Medium an. Der Trend, der anhand der Ergebnisse dieser Arbeit abgeleitet werden kann, könnte in Übereinstimmung mit alternativen Theorien interpretiert werden, die eine überwiegend pathologische Funktion des Enzyms zunehmend in Frage stellen.

Die in dieser Arbeit propagierte, potentielle Beeinflussung adulter neuronaler Stammzellen bereichert die bisher bekannten Effekte MBs um eine vielversprechende Option. Möglicherweise könnte MB u.a. über eine Stimulation der adulten Neurogenese und nachfolgender Migration in der Zukunft das bisher enge Spektrum der AD-Therapien um eine Option bereichern.

Literaturverzeichnis

1. Albers, M. W., M. H. Tabert and D. P. Devanand (2006). "Olfactory dysfunction as a predictor of neurodegenerative disease." *Curr Neurol Neurosci Rep* **6**(5): 379-386.
2. Allen, E. (1912). "The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat." *Jour. Comp. Neur.* **22** no. 6: 547-568.
3. Altman, J., W. J. Anderson and K. A. Wright (1967). "Selective destruction of precursors of microneurons of the cerebellar cortex with fractionated low-dose x-rays." *Exp Neurol* **17**(4): 481-497.
4. Altman, J., W. J. Anderson and K. A. Wright (1969). "Early effects of x-irradiation of the cerebellum in infant rats: decimation and reconstitution of the external granular layer." *Exp Neurol* **24**(2): 196-216.
5. Altman, J. and G. D. Das (1967). "Postnatal neurogenesis in the guinea-pig." *Nature* **214**(5093): 1098-1101.
6. Alvarez-Buylla, A. and J. M. Garcia-Verdugo (2002). "Neurogenesis in adult subventricular zone." *J Neurosci* **22**(3): 629-634.
7. Alvarez-Buylla, A. and D. A. Lim (2004). "For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain." *Neuron* **41**(5): 683-686.
8. Alvarez-Buylla, A. and S. Temple (1998). "Stem cells in the developing and adult nervous system." *J Neurobiol* **36**(2): 105-110.
9. Alves, L., A. S. Correia, R. Miguel, P. Alegria and P. Bugalho (2012). "Alzheimer's disease: a clinical practice-oriented review." *Front Neurol* **3**: 63.
10. Alzheimer, A. (1907). "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und physisch-Gerichtliche Medizin (Berlin)* **64**: 146-148.
11. Anderson, D. J. (2001). "Stem cells and pattern formation in the nervous system: the possible versus the actual." *Neuron* **30**(1): 19-35.
12. Arancio, O. and M. V. Chao (2007). "Neurotrophins, synaptic plasticity and dementia." *Curr Opin Neurobiol* **17**(3): 325-330.
13. Arendt, T. (2009). "Synaptic degeneration in Alzheimer's disease." *Acta Neuropathol* **118**(1): 167-179.
14. Atamna, H. and R. Kumar (2010). "Protective role of methylene blue in Alzheimer's disease via mitochondria and cytochrome c oxidase." *J Alzheimers Dis* **20** Suppl 2: S439-452.
15. Augustinsson, K. B. and D. Nachmansohn (1949). "Distinction between Acetylcholine-Esterase and Other Choline Ester-splitting Enzymes." *Science* **110**(2847): 98-99.
16. Bach, K. K., F. W. Lindsay, L. S. Berg and R. S. Howard (2004). "Prolonged postoperative disorientation after methylene blue infusion during parathyroidectomy." *Anesth Analg* **99**(5): 1573-1574; table of contents.
17. Bekinschtein, P., M. Cammarota, C. Katche, L. Slipczuk, J. I. Rossato, A. Goldin, I. Izquierdo and J. H. Medina (2008). "BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(7): 2711-2716.
18. Benninghoff, J., A. Gritti, M. Rizzi, G. Lamorte, R. J. Schloesser, A. Schmitt, S. Robel, J. Genius, R. Moessner, P. Riederer, H. K. Manji, H. Grunze, D. Rujescu, H. J. Moeller, K. P. Lesch and A. L. Vescovi (2010). "Serotonin depletion hampers survival and proliferation in neurospheres derived from adult neural stem cells." *Neuropsychopharmacology* **35**(4): 893-903.
19. Benninghoff, J., A. Schmitt, R. Mossner and K. P. Lesch (2002). "When cells become depressed: focus on neural stem cells in novel treatment strategies against depression." *J Neural Transm* **109**(5-6): 947-962.
20. Benraiss, A., E. Chmielnicki, K. Lerner, D. Roh and S. A. Goldman (2001). "Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain." *J Neurosci* **21**(17): 6718-6731.
21. Bliss, T. V. and G. L. Collingridge (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." *Nature* **361**(6407): 31-39.
22. Bottai, D., R. Fiocco, F. Gelain, L. Defilippis, R. Galli, A. Gritti and L. A. Vescovi (2003).

- "Neural stem cells in the adult nervous system." *J Hematother Stem Cell Res* **12**(6): 655-670.
23. Boyden, S. (1962). "The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes." *J Exp Med* **115**: 453-466.
 24. Breen, K. C., M. Bruce and B. H. Anderton (1991). "Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion." *J Neurosci Res* **28**(1): 90-100.
 25. Brezun, J. M. and A. Daszuta (1999). "Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats." *Neuroscience* **89**(4): 999-1002.
 26. Brundin, P., J. Karlsson, M. Emgard, G. S. Schierle, O. Hansson, A. Petersen and R. F. Castilho (2000). "Improving the survival of grafted dopaminergic neurons: a review over current approaches." *Cell Transplant* **9**(2): 179-195.
 27. Bu, G. (2009). "Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy." *Nat Rev Neurosci* **10**(5): 333-344.
 28. Busciglio, J., A. Pelsman, C. Wong, G. Pigino, M. Yuan, H. Mori and B. A. Yankner (2002). "Altered metabolism of the amyloid beta precursor protein is associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome." *Neuron* **33**(5): 677-688.
 29. Cai, Z., B. Zhao and A. Ratka (2011). "Oxidative stress and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease." *Neuromolecular Med* **13**(4): 223-250.
 30. Calhoun, M. E., M. Jucker, L. J. Martin, G. Thinakaran, D. L. Price and P. R. Mouton (1996). "Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses." *J Neurocytol* **25**(12): 821-828.
 31. Cameron, H. A. and R. D. McKay (2001). "Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus." *J Comp Neurol* **435**(4): 406-417.
 32. Carleton, A., L. T. Petreanu, R. Lansford, A. Alvarez-Buylla and P. M. Lledo (2003). "Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb." *Nat Neurosci* **6**(5): 507-518.
 33. Carreau, A., C. Kieda and C. Grillon (2011). "Nitric oxide modulates the expression of endothelial cell adhesion molecules involved in angiogenesis and leukocyte recruitment." *Exp Cell Res* **317**(1): 29-41.
 34. Caselli, R. J., T. G. Beach, R. Yaari and E. M. Reiman (2006). "Alzheimer's disease a century later." *J Clin Psychiatry* **67**(11): 1784-1800.
 35. Chen, Y. and B. L. Tang (2006). "The amyloid precursor protein and postnatal neurogenesis/neuroregeneration." *Biochem Biophys Res Commun* **341**(1): 1-5.
 36. Cirrito, J. R., P. C. May, M. A. O'Dell, J. W. Taylor, M. Parsadanian, J. W. Cramer, J. E. Audia, J. S. Nissen, K. R. Bales, S. M. Paul, R. B. DeMattos and D. M. Holtzman (2003). "In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life." *J Neurosci* **23**(26): 8844-8853.
 37. Clare, L., D. E. Linden, R. T. Woods, R. Whitaker, S. J. Evans, C. H. Parkinson, J. van Paasschen, S. M. Nelis, Z. Hoare, K. S. Yuen and M. D. Rugg (2010). "Goal-oriented cognitive rehabilitation for people with early-stage Alzheimer disease: a single-blind randomized controlled trial of clinical efficacy." *Am J Geriatr Psychiatry* **18**(10): 928-939.
 38. Clifton, J., 2nd and J. B. Leikin (2003). "Methylene blue." *Am J Ther* **10**(4): 289-291.
 39. Coers, C. (1952). "The vital staining of muscle biopsies with methylene blue." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **15**(3): 211-215.
 40. Corbett, A., J. Smith and C. Ballard (2012). "New and emerging treatments for Alzheimer's disease." *Expert Rev Neurother* **12**(5): 535-543.
 41. Crews, L., A. Adame, C. Patrick, A. Delaney, E. Pham, E. Rockenstein, L. Hansen and E. Masliah (2010). "Increased BMP6 levels in the brains of Alzheimer's disease patients and APP transgenic mice are accompanied by impaired neurogenesis." *J Neurosci* **30**(37): 12252-12262.
 42. Curtis, M. A., V. F. Low and R. L. Faull (2012). "Neurogenesis and progenitor cells in the adult human brain: a comparison between hippocampal and subventricular progenitor proliferation." *Dev Neurobiol* **72**(7): 990-1005.
 43. Curtis, M. A., E. B. Penney, A. G. Pearson, W. M. van Roon-Mom, N. J. Butterworth, M.

- Dragunow, B. Connor and R. L. Faull (2003). "Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(15): 9023-9027.
44. Deisseroth, K., S. Singla, H. Toda, M. Monje, T. D. Palmer and R. C. Malenka (2004). "Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells." *Neuron* **42**(4): 535-552.
45. DiSanto, A. R. and J. G. Wagner (1972). "Pharmacokinetics of highly ionized drugs. I. Methylene blue--whole blood, urine, and tissue assays." *J Pharm Sci* **61**(4): 598-602.
46. Doetsch, F., J. M. Garcia-Verdugo and A. Alvarez-Buylla (1997). "Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain." *J Neurosci* **17**(13): 5046-5061.
47. Duman, R. S., J. Malberg and S. Nakagawa (2001). "Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress." *J Pharmacol Exp Ther* **299**(2): 401-407.
48. Eichenbaum, H. (2004). "Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory." *Neuron* **44**(1): 109-120.
49. Eriksson, P. S., E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, A. M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson and F. H. Gage (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." *Nat Med* **4**(11): 1313-1317.
50. Falls, D. L. (2003). "Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies." *Exp Cell Res* **284**(1): 14-30.
51. Filbin, M. T. (2003). "Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS." *Nat Rev Neurosci* **4**(9): 703-713.
52. Font, E., E. Desfilis, M. M. Perez-Canellas and J. M. Garcia-Verdugo (2001). "Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain." *Brain Behav Evol* **58**(5): 276-295.
53. Forstl, H. and A. Kurz (1999). "Clinical features of Alzheimer's disease." *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **249**(6): 288-290.
54. Förstl, H. H., W. (1993). Medical Morbidity in Alzheimer's Disease. *Ageing and Dementia*. A. Burns. London, Boston, Melbourne, Auckland, Edward Arnold.
55. Fratiglioni, L., L. J. Launer, K. Andersen, M. M. Breteler, J. R. Copeland, J. F. Dartigues, A. Lobo, J. Martinez-Lage, H. Soininen and A. Hofman (2000). "Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group." *Neurology* **54**(11 Suppl 5): S10-15.
56. Fricker, R. A., M. K. Carpenter, C. Winkler, C. Greco, M. A. Gates and A. Bjorklund (1999). "Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain." *J Neurosci* **19**(14): 5990-6005.
57. Fuchs, E. and E. Gould (2000). "Mini-review: in vivo neurogenesis in the adult brain: regulation and functional implications." *Eur J Neurosci* **12**(7): 2211-2214.
58. Gadadhar, A., R. Marr and O. Lazarov (2011). "Presenilin-1 regulates neural progenitor cell differentiation in the adult brain." *J Neurosci* **31**(7): 2615-2623.
59. Gage, F. H. (2000). "Mammalian neural stem cells." *Science* **287**(5457): 1433-1438.
60. Gaiano, N. and G. Fishell (1998). "Transplantation as a tool to study progenitors within the vertebrate nervous system." *J Neurobiol* **36**(2): 152-161.
61. Galli, R., A. Gritti, L. Bonfanti and A. L. Vescovi (2003). "Neural stem cells: an overview." *Circ Res* **92**(6): 598-608.
62. Garcia-Lopez, P., V. Garcia-Marin and M. Freire (2007). "The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience." *Prog Neurobiol* **83**(2): 110-130.
63. Gerald, Z. and W. Ockert (2013). "Alzheimer's disease market: hope deferred." *Nat Rev Drug Discov* **12**(1): 19-20.
64. Ghashghaei, H. T., C. Lai and E. S. Anton (2007). "Neuronal migration in the adult brain: are we there yet?" *Nat Rev Neurosci* **8**(2): 141-151.
65. Ghosal, K., A. Stathopoulos and S. W. Pimplikar (2010). "APP intracellular domain impairs adult neurogenesis in transgenic mice by inducing neuroinflammation." *PLoS One* **5**(7): e11866.
66. Goh, E. L., D. Ma, G. L. Ming and H. Song (2003). "Adult neural stem cells and repair of the

- adult central nervous system." *J Hematother Stem Cell Res* **12**(6): 671-679.
67. Gottlieb, D. I. (2002). "Large-scale sources of neural stem cells." *Annu Rev Neurosci* **25**: 381-407.
 68. Grandel, H., J. Kaslin, J. Ganz, I. Wenzel and M. Brand (2006). "Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate." *Dev Biol* **295**(1): 263-277.
 69. Gratzner, H. G. (1982). "Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication." *Science* **218**(4571): 474-475.
 70. Green, R. C., L. S. Schneider, D. A. Amato, A. P. Beelen, G. Wilcock, E. A. Swabb and K. H. Zavitz (2009). "Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial." *JAMA* **302**(23): 2557-2564.
 71. Gritti, A., Galli R. and Vescovi AL. (2001). *Cultures of Stem Cells of the Central Nervous System*. Totowa, New Jersey 07512, Humana Press Inc.
 72. Gross, C. G. (2000). "Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma." *Nat Rev Neurosci* **1**(1): 67-73.
 73. Gruetter, C. A., P. J. Kadowitz and L. J. Ignarro (1981). "Methylene blue inhibits coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by nitroglycerin, sodium nitrite, and amyl nitrite." *Can J Physiol Pharmacol* **59**(2): 150-156.
 74. Gura, T. (2008). "Hope in Alzheimer's fight emerges from unexpected places." *Nat Med* **14**(9): 894.
 75. Guttman, P. a. E., P (1891). "Über die Wirkung des Methylenblau bei Malaria " *Berlin Klin. Wochenschr.* **28**: 953-956.
 76. Haass, C. and D. J. Selkoe (2007). "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(2): 101-112.
 77. Hamilton, A. (1901). "The Division of Differentiated Cells in the Central Nervous System of the White Rat." *Jour. Comp. Neur.* **11**: 297-320.
 78. Harbrecht, B. G., B. Wu, S. C. Watkins, T. R. Billiar and A. B. Peitzman (1997). "Inhibition of nitric oxide synthesis during severe shock but not after resuscitation increases hepatic injury and neutrophil accumulation in hemorrhaged rats." *Shock* **8**(6): 415-421.
 79. Harvey, B. H., I. Duvenhage, F. Viljoen, N. Scheepers, S. F. Malan, G. Wegener, C. B. Brink and J. P. Petzer (2010). "Role of monoamine oxidase, nitric oxide synthase and regional brain monoamines in the antidepressant-like effects of methylene blue and selected structural analogues." *Biochem Pharmacol* **80**(10): 1580-1591.
 80. Harvey, J. W. and A. S. Keitt (1983). "Studies of the efficacy and potential hazards of methylene blue therapy in aniline-induced methaemoglobinemia." *Br J Haematol* **54**(1): 29-41.
 81. Haughey, N. J., D. Liu, A. Nath, A. C. Borchard and M. P. Mattson (2002). "Disruption of neurogenesis in the subventricular zone of adult mice, and in human cortical neuronal precursor cells in culture, by amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Neuromolecular Med* **1**(2): 125-135.
 82. Haxby, J. V., K. Raffaele, J. Gillette, M. B. Schapiro and S. I. Rapoport (1992). "Individual trajectories of cognitive decline in patients with dementia of the Alzheimer type." *J Clin Exp Neuropsychol* **14**(4): 575-592.
 83. Hebert, L. E., P. A. Scherr, J. L. Bienias, D. A. Bennett and D. A. Evans (2003). "Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census." *Arch Neurol* **60**(8): 1119-1122.
 84. Hensler, J. G., R. C. Ferry, D. M. Labow, G. B. Kovachich and A. Frazer (1994). "Quantitative autoradiography of the serotonin transporter to assess the distribution of serotonergic projections from the dorsal raphe nucleus." *Synapse* **17**(1): 1-15.
 85. Herrup, K. (2010). "Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis." *J Neurosci* **30**(50): 16755-16762.
 86. His, W. (1904). *Die Entwicklung des menschlichen Gehirns während der ersten Monate*. Leipzig, Hirzel.

87. Hoozemans, J. J., R. Veerhuis, E. S. Van Haastert, J. M. Rozemuller, F. Baas, P. Eikelenboom and W. Scheper (2005). "The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease." *Acta Neuropathol* **110**(2): 165-172.
88. Hu, X., C. W. Hicks, W. He, P. Wong, W. B. Macklin, B. D. Trapp and R. Yan (2006). "Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system." *Nat Neurosci* **9**(12): 1520-1525.
89. Hu, Y. S., P. Xu, G. Pigino, S. T. Brady, J. Larson and O. Lazarov (2010). "Complex environment experience rescues impaired neurogenesis, enhances synaptic plasticity, and attenuates neuropathology in familial Alzheimer's disease-linked APP^{swc}/PS1^{DeltaE9} mice." *FASEB J* **24**(6): 1667-1681.
90. Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2001). "Neurotrophins: roles in neuronal development and function." *Annu Rev Neurosci* **24**: 677-736.
91. Hyman, B. T., G. W. Van Hoesen, K. Beyreuther and C. L. Masters (1989). "A4 amyloid protein immunoreactivity is present in Alzheimer's disease neurofibrillary tangles." *Neurosci Lett* **101**(3): 352-355.
92. Jin, K., V. Galvan, L. Xie, X. O. Mao, O. F. Gorostiza, D. E. Bredesen and D. A. Greenberg (2004). "Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP^{sw},Ind) mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(36): 13363-13367.
93. Jin, K., A. L. Peel, X. O. Mao, L. Xie, B. A. Cottrell, D. C. Henshall and D. A. Greenberg (2004). "Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(1): 343-347.
94. Kempermann, G. (2002). "Regulation of adult hippocampal neurogenesis - implications for novel theories of major depression." *Bipolar Disord* **4**(1): 17-33.
95. Kirschenbaum, B., F. Doetsch, C. Lois and A. Alvarez-Buylla (1999). "Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb." *J Neurosci* **19**(6): 2171-2180.
96. Koelker (1896-1902). *Handbuch der Gewebelehre*.
97. Kokaia, Z. and O. Lindvall (2003). "Neurogenesis after ischaemic brain insults." *Curr Opin Neurobiol* **13**(1): 127-132.
98. Kraepelin, E. (1910). *Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*. Leipzig Barth Verlag.
99. Kress, M., M. Petersen and P. W. Reeh (1997). "Methylene blue induces ongoing activity in rat cutaneous primary afferents and depolarization of DRG neurons via a photosensitive mechanism." *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **356**(5): 619-625.
100. Kristiansen, J. E. (1989). "Dyes, antipsychotic drugs, and antimicrobial activity. Fragments of a development, with special reference to the influence of Paul Ehrlich." *Dan Med Bull* **36**(2): 178-185.
101. Kucukkilinc, T. and I. Ozer (2007). "Multi-site inhibition of human plasma cholinesterase by cationic phenoxazine and phenothiazine dyes." *Arch Biochem Biophys* **461**(2): 294-298.
102. Kuhn, H. G., H. Dickinson-Anson and F. H. Gage (1996). "Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation." *J Neurosci* **16**(6): 2027-2033.
103. LaFerla, F. M. (2010). "Pathways linking Abeta and tau pathologies." *Biochem Soc Trans* **38**(4): 993-995.
104. LaFerla, F. M. and S. Oddo (2005). "Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction." *Trends Mol Med* **11**(4): 170-176.
105. Laird, F. M., H. Cai, A. V. Savonenko, M. H. Farah, K. He, T. Melnikova, H. Wen, H. C. Chiang, G. Xu, V. E. Koliatsos, D. R. Borchelt, D. L. Price, H. K. Lee and P. C. Wong (2005). "BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions." *J Neurosci* **25**(50): 11693-11709.
106. Landhuis, E. (2012). "Will Tau Drug Show Its True Colors in Phase 3 Trials?" *Alzheimer Research Forum - Print News*.
107. Lassmann, H., P. Fischer and K. Jellinger (1993). "Synaptic pathology of Alzheimer's disease." *Ann N Y Acad Sci* **695**: 59-64.

108. Launer, L. J. (2002). "Demonstrating the case that AD is a vascular disease: epidemiologic evidence." *Ageing Res Rev* **1**(1): 61-77.
109. Lazarov, O. and R. A. Marr (2010). "Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads." *Exp Neurol* **223**(2): 267-281.
110. Lazarov, O., M. P. Mattson, D. A. Peterson, S. W. Pimplikar and H. van Praag (2010). "When neurogenesis encounters aging and disease." *Trends Neurosci* **33**(12): 569-579.
111. Lazarov, O., J. Robinson, Y. P. Tang, I. S. Hairston, Z. Korade-Mirnics, V. M. Lee, L. B. Hersh, R. M. Sapolsky, K. Mirnics and S. S. Sisodia (2005). "Environmental enrichment reduces A β levels and amyloid deposition in transgenic mice." *Cell* **120**(5): 701-713.
112. Lee, S. K. and A. Mills (2003). "Novel photochemistry of leuco-Methylene Blue." *Chem Commun (Camb)*(18): 2366-2367.
113. Lemasson, M., A. Saghatelian, J. C. Olivo-Marin and P. M. Lledo (2005). "Neonatal and adult neurogenesis provide two distinct populations of newborn neurons to the mouse olfactory bulb." *J Neurosci* **25**(29): 6816-6825.
114. Leroy, K., K. Ando, C. Heraud, Z. Yilmaz, M. Authelet, J. M. Boeynaems, L. Buee, R. De Decker and J. P. Brion (2010). "Lithium treatment arrests the development of neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice with advanced neurofibrillary pathology." *J Alzheimers Dis* **19**(2): 705-719.
115. Li, L., K. M. Harms, P. B. Ventura, D. C. Lagace, A. J. Eisch and L. A. Cunningham (2010). "Focal cerebral ischemia induces a multilineage cytogenic response from adult subventricular zone that is predominantly gliogenic." *Glia* **58**(13): 1610-1619.
116. Li, Q. and T. C. Sudhof (2004). "Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1." *J Biol Chem* **279**(11): 10542-10550.
117. Liebau, S., B. Vaida, A. Storch and T. M. Boeckers (2007). "Maturation of synaptic contacts in differentiating neural stem cells." *Stem Cells* **25**(7): 1720-1729.
118. Lim, D. A. and A. Alvarez-Buylla (1999). "Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(13): 7526-7531.
119. Lois, C. and A. Alvarez-Buylla (1993). "Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(5): 2074-2077.
120. Lois, C. and A. Alvarez-Buylla (1994). "Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain." *Science* **264**(5162): 1145-1148.
121. Lois, C., J. M. Garcia-Verdugo and A. Alvarez-Buylla (1996). "Chain migration of neuronal precursors." *Science* **271**(5251): 978-981.
122. Lopez-Toledano, M. A. and M. L. Shelanski (2004). "Neurogenic effect of beta-amyloid peptide in the development of neural stem cells." *J Neurosci* **24**(23): 5439-5444.
123. Luna-Munoz, J., J. Peralta-Ramirez, L. Chavez-Macias, C. R. Harrington, C. M. Wischik and R. Mena (2008). "Thiazin red as a neuropathological tool for the rapid diagnosis of Alzheimer's disease in tissue imprints." *Acta Neuropathol* **116**(5): 507-515.
- Luo, J., S. B. Daniels, J. B. Lenington, R. Q. Notti and J. C. Conover (2006). "The aging neurogenic subventricular zone." *Aging Cell* **5**(2): 139-152.
124. Ma, H., S. Lesne, L. Kotilinek, J. V. Steidl-Nichols, M. Sherman, L. Younkin, S. Younkin, C. Forster, N. Sergeant, A. Delacourte, R. Vassar, M. Citron, P. Kofuji, L. M. Boland and K. H. Ashe (2007). "Involvement of beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) in amyloid precursor protein-mediated enhancement of memory and activity-dependent synaptic plasticity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(19): 8167-8172.
125. Magavi, S. S., B. R. Leavitt and J. D. Macklis (2000). "Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice." *Nature* **405**(6789): 951-955.
126. Mark, R. J., J. N. Keller, I. Kruman and M. P. Mattson (1997). "Basic FGF attenuates amyloid beta-peptide-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and impairment of Na⁺/K⁺-ATPase activity in hippocampal neurons." *Brain Res* **756**(1-2): 205-214.
127. Mason, H. A., S. Ito and G. Corfas (2001). "Extracellular signals that regulate the tangential migration of olfactory bulb neuronal precursors: inducers, inhibitors, and repellents." *J Neurosci* **21**(19): 7654-7663.

128. Mattson, M. P. (1997). "Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives." *Physiol Rev* **77**(4): 1081-1132.
129. Mattson, M. P., S. Maudsley and B. Martin (2004). "BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders." *Trends Neurosci* **27**(10): 589-594.
130. Maurer, K., S. Volk and H. Gerbaldo (1997). "Auguste D and Alzheimer's disease." *Lancet* **349**(9064): 1546-1549.
131. Mayer, B., F. Brunner and K. Schmidt (1993). "Novel actions of methylene blue." *Eur Heart J* **14 Suppl I**: 22-26.
132. Mena, R., P. Edwards, O. Perez-Olvera and C. M. Wischik (1995). "Monitoring pathological assembly of tau and beta-amyloid proteins in Alzheimer's disease." *Acta Neuropathol* **89**(1): 50-56.
133. Mendlin, A., F. J. Martin and B. L. Jacobs (1998). "Involvement of dopamine D2 receptors in apomorphine-induced facilitation of forebrain serotonin output." *Eur J Pharmacol* **351**(3): 291-298.
134. Mesulam, M. M., C. Geula and M. A. Moran (1987). "Anatomy of cholinesterase inhibition in Alzheimer's disease: effect of physostigmine and tetrahydroaminoacridine on plaques and tangles." *Ann Neurol* **22**(6): 683-691.
135. Mezey, E., K. J. Chandross, G. Harta, R. A. Maki and S. R. McKercher (2000). "Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow." *Science* **290**(5497): 1779-1782.
136. Ming, G. L. and H. Song (2005). "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system." *Annu Rev Neurosci* **28**: 223-250.
137. Mu, Y. and F. H. Gage (2011). "Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease." *Mol Neurodegener* **6**: 85.
138. Muller, T. (1998). "Methylene blue supravital staining: an evaluation of its applicability to the mammalian brain and pineal gland." *Histol Histopathol* **13**(4): 1019-1026.
139. Muller, W. (1952). "[Theoretical basis and clinical reliability of the methylene blue test in the urine]." *Dtsch Arch Klin Med* **199**(4): 423-430.
140. Murase, S. and A. F. Horwitz (2002). "Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream." *J Neurosci* **22**(9): 3568-3579.
141. Nakatomi, H., T. Kuriu, S. Okabe, S. Yamamoto, O. Hatano, N. Kawahara, A. Tamura, T. Kirino and M. Nakafuku (2002). "Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors." *Cell* **110**(4): 429-441.
142. Necula, M., L. Breydo, S. Milton, R. Kaye, W. E. van der Veer, P. Tone and C. G. Glabe (2007). "Methylene blue inhibits amyloid A β oligomerization by promoting fibrillization." *Biochemistry* **46**(30): 8850-8860.
143. Nemeth, P. R., K. Daly, S. Erde and J. D. Wood (1985). "Effects of methylene blue on electrical behavior of myenteric neurons." *Experientia* **41**(2): 259-261.
144. Nichol, K., S. P. Deeny, J. Seif, K. Camaclang and C. W. Cotman (2009). "Exercise improves cognition and hippocampal plasticity in APOE epsilon4 mice." *Alzheimers Dement* **5**(4): 287-294.
145. Nussbaum, R. L. and C. E. Ellis (2003). "Alzheimer's disease and Parkinson's disease." *N Engl J Med* **348**(14): 1356-1364.
146. O'Leary, J. C., 3rd, Q. Li, P. Marinec, L. J. Blair, E. E. Congdon, A. G. Johnson, U. K. Jinwal, J. Koren, 3rd, J. R. Jones, C. Kraft, M. Peters, J. F. Abisambra, K. E. Duff, E. J. Weeber, J. E. Gestwicki and C. A. Dickey (2010). "Phenothiazine-mediated rescue of cognition in tau transgenic mice requires neuroprotection and reduced soluble tau burden." *Mol Neurodegener* **5**: 45.
147. Oddo, S., V. Vasilevko, A. Caccamo, M. Kitazawa, D. H. Cribbs and F. M. LaFerla (2006). "Reduction of soluble A β and tau, but not soluble A β alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles." *J Biol Chem* **281**(51): 39413-39423.
148. Oz, M., D. E. Lorke, M. Hasan and G. A. Petroianu (2011). "Cellular and molecular actions of

- Methylene Blue in the nervous system." *Med Res Rev* **31**(1): 93-117.
149. Oz, M., D. E. Lorke and G. A. Petroianu (2009). "Methylene blue and Alzheimer's disease." *Biochem Pharmacol* **78**(8): 927-932.
 150. Palmer, T. D., E. A. Markakis, A. R. Willhoite, F. Safar and F. H. Gage (1999). "Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS." *J Neurosci* **19**(19): 8487-8497.
 151. Palmer, T. D., P. H. Schwartz, P. Taupin, B. Kaspar, S. A. Stein and F. H. Gage (2001). "Cell culture. Progenitor cells from human brain after death." *Nature* **411**(6833): 42-43.
 152. Parent, J. M. (2003). "Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain." *Neuroscientist* **9**(4): 261-272.
 153. Pascual-Leone, A., C. Freitas, L. Oberman, J. C. Horvath, M. Halko, M. Eldaief, S. Bashir, M. Vernet, M. Shafi, B. Westover, A. M. Vahabzadeh-Hagh and A. Rotenberg (2011). "Characterizing brain cortical plasticity and network dynamics across the age-span in health and disease with TMS-EEG and TMS-fMRI." *Brain Topogr* **24**(3-4): 302-315.
 154. Pencea, V., K. D. Bingaman, L. J. Freedman and M. B. Luskin (2001). "Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain." *Exp Neurol* **172**(1): 1-16.
 155. Pencea, V., K. D. Bingaman, S. J. Wiegand and M. B. Luskin (2001). "Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus." *J Neurosci* **21**(17): 6706-6717.
 156. Perl, D. P. (2010). "Neuropathology of Alzheimer's disease." *Mt Sinai J Med* **77**(1): 32-42.
 - Pernot, F., F. Dorandeu, C. Beaup and A. Peinnequin (2010). "Selection of reference genes for real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in hippocampal structure in a murine model of temporal lobe epilepsy with focal seizures." *J Neurosci Res* **88**(5): 1000-1008.
 157. Perry, E. K., R. H. Perry, G. Blessed and B. E. Tomlinson (1977). "Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia." *Lancet* **1**(8004): 189.
 158. Perry, G., R. Friedman, G. Shaw and V. Chau (1987). "Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(9): 3033-3036.
 159. Peter, C., D. Hongwan, A. Kupfer and B. H. Lauterburg (2000). "Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue." *Eur J Clin Pharmacol* **56**(3): 247-250.
 160. Pfaffendorf, M., T. A. Bruning, H. D. Batnik and P. A. van Zwieten (1997). "The interaction between methylene blue and the cholinergic system." *Br J Pharmacol* **122**(1): 95-98.
 161. Phillips, H. S., J. M. Hains, M. Armanini, G. R. Laramée, S. A. Johnson and J. W. Winslow (1991). "BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease." *Neuron* **7**(5): 695-702.
 162. Potten, C. S. and M. Loeffler (1990). "Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt." *Development* **110**(4): 1001-1020.
 163. Puzzo, D. and O. Arancio (2013). "Amyloid-beta peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde?" *J Alzheimers Dis* **33 Suppl 1**: S111-120.
 164. Puzzo, D., L. Privitera, E. Leznik, M. Fa, A. Staniszewski, A. Palmeri and O. Arancio (2008). "Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus." *J Neurosci* **28**(53): 14537-14545.
 165. Querfurth, H. W. and F. M. LaFerla (2010). "Alzheimer's disease." *N Engl J Med* **362**(4): 329-344.
 166. Quinones-Hinojosa, A., N. Sanai, M. Soriano-Navarro, O. Gonzalez-Perez, Z. Mirzadeh, S. Gil-Perotin, R. Romero-Rodriguez, M. S. Berger, J. M. Garcia-Verdugo and A. Alvarez-Buylla (2006). "Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells." *J Comp Neurol* **494**(3): 415-434.
 167. Rakic, P. (1985). "Limits of neurogenesis in primates." *Science* **227**(4690): 1054-1056.
 168. Ramon y Cajal, S. (1913). *Degeneration and Regeneration of the Central Nervous System* London: Oxford Univ. Press.
 169. Ramsay, R. R., C. Dunford and P. K. Gillman (2007). "Methylene blue and serotonin toxicity:

- inhibition of monoamine oxidase A (MAO A) confirms a theoretical prediction." *Br J Pharmacol* **152**(6): 946-951.
170. Ray, J., D. A. Peterson, M. Schinstine and F. H. Gage (1993). "Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(8): 3602-3606.
 171. Reddy, P. H. (2011). "Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease." *Brain Res* **1415**: 136-148.
 172. Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." *Science* **255**(5052): 1707-1710.
 173. Riha, P. D., A. K. Bruchey, D. J. Echevarria and F. Gonzalez-Lima (2005). "Memory facilitation by methylene blue: dose-dependent effect on behavior and brain oxygen consumption." *Eur J Pharmacol* **511**(2-3): 151-158.
 174. Rohe, M., A. S. Carlo, H. Breyhan, A. Sporbert, D. Miltz, V. Schmidt, C. Wozny, A. Harmeier, B. Erdmann, K. R. Bales, S. Wolf, G. Kempermann, S. M. Paul, D. Schmitz, T. A. Bayer, T. E. Willnow and O. M. Andersen (2008). "Sortilin-related receptor with A-type repeats (SORLA) affects the amyloid precursor protein-dependent stimulation of ERK signaling and adult neurogenesis." *J Biol Chem* **283**(21): 14826-14834.
 175. Rohwedel, J., K. Guan, C. Hegert and A. M. Wobus (2001). "Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects." *Toxicol In Vitro* **15**(6): 741-753.
 176. Rubenstein, J. L., P. Greengard and A. J. Czernik (1993). "Calcium-dependent serine phosphorylation of synaptophysin." *Synapse* **13**(2): 161-172.
 177. Sabo, S. L., A. F. Ikin, J. D. Buxbaum and P. Greengard (2001). "The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement." *J Cell Biol* **153**(7): 1403-1414.
 178. Salbaum, J. M. and F. H. Ruddle (1994). "Embryonic expression pattern of amyloid protein precursor suggests a role in differentiation of specific subsets of neurons." *J Exp Zool* **269**(2): 116-127.
 179. Scalia, R., V. E. Armstead, A. G. Minchenko and A. M. Lefer (1999). "Essential role of P-selectin in the initiation of the inflammatory response induced by hemorrhage and reinfusion." *J Exp Med* **189**(6): 931-938.
 180. Schirmer, R. H., H. Adler, M. Pickhardt and E. Mandelkow (2011). "'Lest we forget you--methylene blue...'" *Neurobiol Aging* **32**(12): 2325 e2327-2316.
 181. Selkoe, D. J. (2001). "Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein." *J Alzheimers Dis* **3**(1): 75-80.
 182. Sheline, Y. I., P. W. Wang, M. H. Gado, J. G. Csernansky and M. W. Vannier (1996). "Hippocampal atrophy in recurrent major depression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(9): 3908-3913.
 183. Sidman, R. L., I. L. Miale and N. Feder (1959). "Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system." *Exp Neurol* **1**: 322-333.
 184. Sinha, S., J. P. Anderson, R. Barbour, G. S. Basi, R. Caccavello, D. Davis, M. Doan, H. F. Dovey, N. Frigon, J. Hong, K. Jacobson-Croak, N. Jewett, P. Keim, J. Knops, I. Lieberburg, M. Power, H. Tan, G. Tatsuno, J. Tung, D. Schenk, P. Seubert, S. M. Suomensaaari, S. Wang, D. Walker, J. Zhao, L. McConlogue and V. John (1999). "Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain." *Nature* **402**(6761): 537-540.
 185. Smart, I. H. (1976). "A pilot study of cell production by the ganglionic eminences of the developing mouse brain." *J Anat* **121**(Pt 1): 71-84.
 186. Sontag, E. M., G. P. Lotz, N. Agrawal, A. Tran, R. Aron, G. Yang, M. Necula, A. Lau, S. Finkbeiner, C. Glabe, J. L. Marsh, P. J. Muchowski and L. M. Thompson (2012). "Methylene blue modulates huntingtin aggregation intermediates and is protective in Huntington's disease models." *J Neurosci* **32**(32): 11109-11119.

187. Spector, A., L. Thorgrimsen, B. Woods, L. Royan, S. Davies, M. Butterworth and M. Orrell (2003). "Efficacy of an evidence-based cognitive stimulation therapy programme for people with dementia: randomised controlled trial." *Br J Psychiatry* **183**: 248-254.
188. Stelzmann, R. A. S., H.N.; Murtagh, F.R. (1995). "An English Translation of Alzheimer's 1907 Paper, "Übe eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde"." *Clinical Anatomy* **8**: 429-431.
189. Stone, S. S., C. M. Teixeira, L. M. Devito, K. Zaslavsky, S. A. Josselyn, A. M. Lozano and P. W. Frankland (2011). "Stimulation of entorhinal cortex promotes adult neurogenesis and facilitates spatial memory." *J Neurosci* **31**(38): 13469-13484.
190. Sullivan, K. (2008). "A survey of community awareness of Alzheimer's disease: what are the common misconceptions?" *Int J Geriatr Psychiatry* **23**(12): 1320-1322.
191. Taniguchi, S., N. Suzuki, M. Masuda, S. Hisanaga, T. Iwatsubo, M. Goedert and M. Hasegawa (2005). "Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins." *J Biol Chem* **280**(9): 7614-7623.
192. Tariot, P. N., L. S. Schneider, J. Cummings, R. G. Thomas, R. Raman, L. J. Jakimovich, R. Loy, B. Bartocci, A. Fleisher, M. S. Ismail, A. Porsteinsson, M. Weiner, C. R. Jack, Jr., L. Thal and P. S. Aisen (2011). "Chronic divalproex sodium to attenuate agitation and clinical progression of Alzheimer disease." *Arch Gen Psychiatry* **68**(8): 853-861.
193. Tattersfield, A. S., R. J. Croon, Y. W. Liu, A. P. Kells, R. L. Faull and B. Connor (2004). "Neurogenesis in the striatum of the quinolinic acid lesion model of Huntington's disease." *Neuroscience* **127**(2): 319-332.
194. Temple, S. (2001). "The development of neural stem cells." *Nature* **414**(6859): 112-117.
195. Terry, R. D. (1963). "The Fine Structure of Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease." *J Neuropathol Exp Neurol* **22**: 629-642.
196. Thuneberg, L. (1990). "Methylene blue as a pharmacological probe of intestinal pacemaker activity." *Am J Physiol* **258**(6 Pt 1): G992-994.
197. Tramontin, A. D., J. M. Garcia-Verdugo, D. A. Lim and A. Alvarez-Buylla (2003). "Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment." *Cereb Cortex* **13**(6): 580-587.
198. van Praag, H., A. F. Schinder, B. R. Christie, N. Toni, T. D. Palmer and F. H. Gage (2002). "Functional neurogenesis in the adult hippocampus." *Nature* **415**(6875): 1030-1034.
199. Vassar, R., D. M. Kovacs, R. Yan and P. C. Wong (2009). "The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential." *J Neurosci* **29**(41): 12787-12794.
200. Vutsits, L., A. Briner, P. Klausner, E. Gascon, A. G. Dayer, J. Z. Kiss, D. Muller, M. J. Licker and D. R. Morel (2008). "Adverse effects of methylene blue on the central nervous system." *Anesthesiology* **108**(4): 684-692.
201. Wagner, S. J., A. Skripchenko, D. Robinette, D. A. Mallory and L. Cincotta (1998). "Preservation of red cell properties after virucidal phototreatment with dimethylmethylene blue." *Transfusion* **38**(8): 729-737.
202. Wainwright, M. (2003). "The use of dyes in modern biomedicine." *Biotech Histochem* **78**(3-4): 147-155.
203. Wainwright, M. and L. Amaral (2005). "The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs." *Trop Med Int Health* **10**(6): 501-511.
204. Wainwright, M. and K. B. Crossley (2002). "Methylene Blue--a therapeutic dye for all seasons?" *J Chemother* **14**(5): 431-443.
205. Walsh, D. M. and D. J. Selkoe (2004). "Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease." *Neuron* **44**(1): 181-193.
206. Walter-Sack, I., J. Rengelshausen, H. Oberwittler, J. Burhenne, O. Mueller, P. Meissner and G. Mikus (2009). "High absolute bioavailability of methylene blue given as an aqueous oral formulation." *Eur J Clin Pharmacol* **65**(2): 179-189.
207. Walther, D. J., J. U. Peter, S. Bashammakh, H. Hortnagl, M. Voits, H. Fink and M. Bader (2003). "Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform." *Science* **299**(5603): 76.

208. Wang, H., L. Song, F. Laird, P. C. Wong and H. K. Lee (2008). "BACE1 knock-outs display deficits in activity-dependent potentiation of synaptic transmission at mossy fiber to CA3 synapses in the hippocampus." *J Neurosci* **28**(35): 8677-8681.
209. Wang, Y. Z., J. M. Plane, P. Jiang, C. J. Zhou and W. Deng (2011). "Concise review: Quiescent and active states of endogenous adult neural stem cells: identification and characterization." *Stem Cells* **29**(6): 907-912.
210. Weissman, I. L. (2000). "Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution." *Cell* **100**(1): 157-168.
211. Werner, I., F. Guo, N. V. Bogert, U. A. Stock, P. Meybohm, A. Moritz and A. Beiras-Fernandez (2013). "Methylene blue modulates transendothelial migration of peripheral blood cells." *PLoS One* **8**(12): e82214.
212. Wiklund, L., S. Basu, A. Miculescu, P. Wiklund, G. Ronquist and H. S. Sharma (2007). "Neuro- and cardioprotective effects of blockade of nitric oxide action by administration of methylene blue." *Ann N Y Acad Sci* **1122**: 231-244.
213. Wimo, A. P. M. (2010). World Alzheimer Report 2010. *Alzheimer's Disease International*. London (UK), 2010.
214. Wischik, C. and R. Staff (2009). "Challenges in the conduct of disease-modifying trials in AD: practical experience from a phase 2 trial of Tau-aggregation inhibitor therapy." *J Nutr Health Aging* **13**(4): 367-369.
215. Wischik, C. M., P. C. Edwards, R. Y. Lai, M. Roth and C. R. Harrington (1996). "Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20): 11213-11218.
216. Yamada, K. and T. Nabeshima (2003). "Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes." *J Pharmacol Sci* **91**(4): 267-270.
217. Yang, C. P., J. A. Gilley, G. Zhang and S. G. Kernie (2011). "ApoE is required for maintenance of the dentate gyrus neural progenitor pool." *Development* **138**(20): 4351-4362.
218. Yankner, B. A., L. K. Duffy and D. A. Kirschner (1990). "Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides." *Science* **250**(4978): 279-282.
219. Yu, F., K. M. Rose, S. C. Burgener, C. Cunningham, L. L. Buettner, E. Beattie, A. L. Bossen, K. C. Buckwalter, D. M. Fick, S. Fitzsimmons, A. Kolanowski, K. Janet, P. Specht, N. E. Richeson, I. Testad and S. E. McKenzie (2009). "Cognitive training for early-stage Alzheimer's disease and dementia." *J Gerontol Nurs* **35**(3): 23-29.
220. Zhou, Z. D., C. H. Chan, Q. H. Ma, X. H. Xu, Z. C. Xiao and E. K. Tan (2011). "The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease." *Cell Adh Migr* **5**(4): 280-292.
221. Zigova, T., V. Pencea, S. J. Wiegand and M. B. Luskin (1998). "Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb." *Mol Cell Neurosci* **11**(4): 234-245.

Anhang

7.1. Abbildungs-, und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Stoffwechselwege des Amyloid-Precursor-Proteins APP	19
Abbildung 2: Grundlagen der adulter neuronaler Stammzellen <i>in vitro</i>	30
Abbildung 3: Boyden Chamber vor bzw. nach der zellulären Migration.	37
Abbildung 4: Ergebnisse der Wachstumskurven.....	45
Abbildung 5: Immunfärbung undifferenzierter ANSC	47
Abbildung 6: Ergebnisse des BrdU-Assay (einzeln)	48
Abbildung 7: Ergebnisse des BrdU-Assay (gesamt).	49
Abbildung 8: Box-Plot-Diagramm der Migrationsergebnisse	50
Abbildung 9: qPCR-Ergebnisse für β -Amyloid Precursor Enzym-1 (BACE-1).....	53
Abbildung 10: qPCR-Ergebnisse für Synaptophysin (SYP)	55
Abbildung 11: qPCR-Ergebnisse für Tryptophan-Hydroxylase-2 (TPH-2).....	56
Abbildung 12: qPCR-Ergebnisse für Brain-Derived-Neurotrophic-Factor (BDNF).....	57
Tabelle 1: Primersequenzen der quantitativen PCR.....	42

7.2. Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid- β
AchE	Acetylcholinesterase
AD	Alzheimer Demenz
AICD	APP Intracellular Domain
APP	Amyloid-Precursor-Protein
ANSC	Adult Neuronal Stem Cells
BACE	β -Amyloid-Cleaving-Enzyme
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BrdU	5-Bromo-2'Deoxyuridin
DAPI	4,6 Diamino-2-Phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EGF	Epidermal Growth Factor
FGF	Fibroblast Growth Factor
MB	Methylenblau/ Tetramethylthionin-Chlorid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
qPCR	quantitative PCR
SGZ	Subgranularzone
SSRI	Selective-Serotonin-Reuptake-Inhibitor
SVZ	Subventrikularzone
SYP	Synaptophysin
TPH	Tryptophan-Hydroxylase
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.3. Geräte und Materialien

Arbeitsbank	Laminar Flow
Boyden Chamber	Fisher Scientific
Cryo-Tube , 1800µl	Nunc
Deckglas, 24x60mm	Menzel Gläser
Falcon Tubes, 25ml	Becton Dickinson
Glas-Pasteur-Pipette	
Inkubator	Binder 1, CO2 Begasungsschrank
Kulturschalen	Sarstedt
Tissue culture flask T75	
Tissue culture flask T25	
Microzentrifuge	Eppendorf
Mikroskop	Zeiss, Axioplan
Neubauer Zählkammer	Fisher Scientific
Objektträger	Menzel Gläser, SuperFrost Ultra
Photometer	Tecan Magellan
Pipette, 10ml	Eppendorf
Pipette (1000µl, 200µl, 10µl, 2µl)	Eppendorf
Polycarbonatmembranen, 13mm	Micron
Rotorgene	Quiagen
RT-PCR Reaktionsröhrchen	Eppendorf
Rüttler	Fisher Scientific
Steriler Filter	Thermo Scientific
Versuchsröhrchen, 2ml	Eppendorf
Zählpuffer	Coulter Isoton II Diluent
Zählbehältnis	Beckmann & Coulter, Coulter Counter
	Accuvette ST. 25x25ml
Zellzähler	Beckman Intrument,
	Particle count & Size Analyzer
Zentrifuge	Hettich
24-Loch-Platte	Sarstedt
48-Loch Platte	Nunc, Nunclon Surface
96-Loch Platte	Sarstedt

Alamar Blue Reagent	Invitrogen
Amersham Cell Proliferation Biotrak System	GE Healthcare
Labeling Reagent	
gefriergetrocknete Nuklease	
spezifischer Antikörper (Anti-BrdU)	
Anti-Fade MoBiGlow	MoBiTech
Cy3 markierter Antikörper	Dianova
Goat Anti Mouse, whole IgG H+L	
DAPI	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DMEM Dulbecco's modified Eagle Medium	Invitrogen
DNase Lösung	Quiagen
DNase Stock Solution, Puffer RDD,	
RNase-free DNase Set	
DPX	Sigma-Aldrich
Giemsa	Sigma-Aldrich
Matrigel	BD Biosciences
Methylthionium-Chlorid (CAS-Nr. 7220-79-3)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Random Hexamer Primers	Invitrogen
RNEasy Mini Kit	Quiagen
RLT Lysis Buffer	
QiaShredder Säule	
Mini Spin Column	
Wasch-Puffer (RW1, RPE)	
Collection Tube, 1.5ml, 2.0ml	
RNase Inhibitor	Invitrogen
RNase freies (DEPC-behandeltes) Wasser	
RNase H	Invitrogen
Superscript II RT (15U/μl)	Invitrogen
cDNA Synthese Puffer	
Dithiothreitol (DTT)	
SYBR Green	Invitrogen
3' allelspezifischer Primer	Invitrogen
5' allelspezifischer Primer	Invitrogen

7.4. Stammlösungen

Frosting Solution

900 µl Vollmedium

100 µl DMSO

Phosphatgepufferte Salzlösung (1x PBS)

1 l A.dest.

8 g NaCl

0.2 g KCl

1.424 g Na₂HPO₄

0.2 g KH₂PO₄

Stock Solution

11.2 mg Methylthionium-Chlorid

30 ml DMEM

Vollmedium (Completo)

80 ml Aqua bidest

20 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

4 ml D (+) Glucose 30%

3 ml NaHCO₃

1 ml HEPES 1M

2 ml L-Glutamin 200mM

2 ml Pen/Strep

400 µl Heparin 0,2%

20 ml Hormon-Mix

400 mg BSA gelöst in 67 ml Aqua bidest

8 µl EGF

8 µl FGF

2 ml Amphotericin

2 ml Gentamycin

6 ml Kontrolllo 3% FCS (fetales Kalbsserum) ohne EGF/FGF

4 ml Trehalose 30%

70% Ethanol

700 ml Ethanol

ad 1000 ml A.dest.

